

Travail du Laboratoire

Andrée ROCHE

SERVICE DE CHIMIE

3

SUR LE TITRAGE BIOLOGIQUE DE
L'ACTIVITÉ ANTIANÉMIQUE DES EXTRAITS DE FOIE

T H E S E

*présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine
Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille*
le 1953

P A R

Maurice VERMEULEN

né le 8 Juin 1920 à NICE (A.-M.)

PHARMACIEN

Assistant de Chimie Médicale

Certifié de Chimie Biologique et de Physiologie générale.
pour obtenir le grade de DOCTEUR en PHARMACIE
Diplôme d'Etat

EXAMINATEURS DE LA THESE

MM. C. DUMAZERT, Professeur	Président
L. VIGNOLI, »	Assesseur
J. DELPHAUT, »	»
Y. DERRIEN, »	»

1954



PERSONNEL ENSEIGNANT

DE LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : G. MORIN

Assesseur : J. DELPHAUT

Doyen Honoraire : L. IMBERT

Professeurs Honoraires : MM. AUBARET, AUDIBERT, BELTRAMI, BREMOND,
GAUJOUX, GABRIEL, HECKENROTH, JOYEUX,
OLMER, RIMATTEI, ROCHE, ROGER,

Chargé de Cours Honoraires : M. TIAN

Secrétaire : J. COMTE

Bibliothécaire : M^{lle} PERRIN

Professeurs

Anatomie	GRISOLI
Anatomie Pathologique et Carcinologie clinique	GASTAUD
Bactériologie et Pathologie Générale	BRAHIC
Chimie Analytique et Hydrologie	ARNOUX
Chimie Médicale	DERRIEN
Chimie	DUMAZERT
Clinique Chirurgicale	FIOLLE
Clinique Chirurgicale	MOIROUD
Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédique	SALMON
Clinique Chirurgicale Thérapeutique et Chirurgie Expéri- mentale	DE VERNEJOL
Clinique Dermato-syphiligraphique	CHARPY
Clinique Exotique	BLANC
Clinique des Maladies du Système Nerveux	POURSINES
Clinique Médicale	MATTEI
Clinique Médicale	POINSO
Clinique Médicale Thérapeutique	OLMER
Clinique des Maladies des Voies Digestives et de la Nutrition	MONGES
Clinique Médicale Infantile	GIRAUD
Clinique Neuro-Chirurgicale	PAILLAS
Clinique Obstétricale et Gynécologie	CHOSSON
Clinique Ophtalmologie	JAYLE
Clinique Urologique	CHAUVIN
Histoire Naturelle	PELISSIER
Histologie	ROMIEU
Hygiène et Médecine Préventive	SAUTET
Matière Médicale	BALANSARD
Médecine Légale et Médecine du Travail	MOSINGER
Parasitologie	N...
Pathologie Chirurgicale	CARCASSONNE
Pharmacologie	F. MERCIER

<i>Pharmacie Chimique et Toxicologie</i>	VIGNOLI
<i>Pharmacie Galénique</i>	DELPHAUT
<i>Physiologie</i>	MORIN
<i>Physique Médicale</i>	DUBOULOZ
<i>Thérapeutique</i>	PIERI

Maîtres de conférences agrégés

MM. BOURRET	MM. MOURGUE
DONNET	PICARD
GREBUS	RANQUE
J. MERCIER	ROUX

Agrégés en exercice

MM. APPAIX	MM. MARONNEAUD
BERNARD	MONGES Henri
CREMIEUX	OLLIVIER
GRANJON	OURGAUD
HENRY	PAOLI
JOUE	RAYBAUD
LAMY	SÉRMENT
LAVAL	VAGUE
LENA	

Agrégés libres

MM. AUDIER	MM. FIGARELLA
BERTHIER	RECORDIER
DOR	IMBERT

Chargé des fonctions d'agrégé

<i>Anatomie Pathologique</i>	M. PAYAN
------------------------------------	----------



A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

A TOUS MES PARENTS ET AMIS

A MON MAITRE, MONSIEUR LE PROFESSEUR C. DUMAZERT

Pendant les années passées à ses côtés, il n'a cessé de m'encourager avec bienveillance et de me guider avec clarté. Je lui dois mon initiation à la Chimie et ma formation scientifique. Je le remercie de la discipline de travail qu'il m'a inculquée. Qu'il veuille bien croire à mon affection respectueuse et à mon fidèle attachement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR Y. DERRIEN

En témoignage de profonde gratitude pour l'intérêt bienveillant qu'il a toujours manifesté à mon égard et pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'acceptant parmi les membres de son service.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MONSIEUR LE PROFESSEUR L. VIGNOLI

*Je ne saurai assez le remercier
pour la bienveillante sollicitude
que, depuis de longues années, il
me témoigne. Qu'il veuille bien
trouver, dans l'hommage que je lui
fais de ce travail, la preuve de ma
respectueuse gratitude.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. DELPHAUT

*Qu'il veuille bien trouver ici
l'expression de mes remerciements
respectueux pour l'intérêt qu'il m'a
toujours montré et pour l'honneur
qu'il me fait en acceptant de faire
partie de mon Jury.*

A MES CAMARADES DU LABORATOIRE DE CHIMIE,

DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE

ET DU LABORATOIRE MUNICIPAL DE CHIMIE ET DE BIOLOGIE

INTRODUCTION

L'anémie est un état caractérisé par une diminution marquée du taux sanguin de l'hémoglobine, dont la conséquence directe est un abaissement de la capacité respiratoire du sang. Le problème posé par cette définition élémentaire est d'une extrême complexité. En fait, l'anémie admet diverses causes ; il en résulte qu'elle peut revêtir des aspects et suivre des évolutions si dissemblables que l'on doit envisager l'existence de multiples anémies.

L'évolution de nos connaissances sur cette question a procédé par étapes : étape clinique, où l'empirisme initial a fait progressivement place à des observations précises grâce à des examens de laboratoire ; étape physiologique, enrichie des premières contributions de la pathologie expérimentale et de la biochimie ; enfin, étape biochimique, consacrée à la recherche des principes antianémiques. Nous nous attarderons surtout aux résultats acquis dans la dernière en les faisant précéder d'un bref rappel sur les manifestations sanguines et médullaires des anémies et sur le mécanisme physiologique de leur production.

I. — MANIFESTATIONS SANGUINES ET MEDULLAIRES DES ANEMIES ET NOTIONS GENERALES SUR LE MECANISME DE PRODUCTION DES ANEMIES

Il y a moins d'un siècle, les médecins en étaient réduits à classer les anémies en deux groupes : celles guérissant sous l'effet d'un régime riche et varié, de l'altitude, de l'administration de médicaments contenant du fer, de l'arsenic, et celles dites pernicieuses, évoluant fatalement vers la mort.

Il n'y a pas lieu de présenter ici une classification détaillée des anémies (*) et nous nous bornerons à indiquer très schématiquement les caractères qui ont permis d'en identifier les différents types.

La manifestation la plus évidente de l'anémie est la pâleur de la peau et surtout des muqueuses, s'accompagnant fréquemment d'œdèmes malcollaires, de la face, et même d'anasarque et, par ailleurs, de souffles cardiaques organiques, de troubles digestifs et nerveux. L'étude du sang et de la moelle osseuse donne les indications les plus précises. En effet, les hématies prennent naissance dans la moelle, passent dans le sang, puis sont détruites dans le foie et dans la rate. Les matériaux nécessaires à leur édification sont les acides aminés constituant la globine, les noyaux pyrroliques de l'hématoporphyrine et le fer.

Le fer est un facteur limitant absolu, car chez un chien anémique, maintenu en bonne santé par un régime suffisant par ailleurs mais apportant peu de fer, la production hebdomadaire d'hémoglobine est limitée à deux grammes ; après épuisement des réserves en fer la nécessité d'administration de ce dernier est inéluctable.

En ce qui concerne le radical, les expériences avec le glycocolle marqué (142, 170, 236) ont solidement établi que les quatre atomes d'azote des noyaux pyrrole de la protoporphyrine proviennent de cet acide aminé. Mais le glycocolle n'est pas seul en cause ; la participation de deux molécules d'un composé à quatre carbones, formé à partir de l'acide acétique a été mise en évidence, toujours par l'emploi des isotopes radio-actifs. Cependant la connaissance de la synthèse du groupement tétrapyrrolique est encore incomplète.

Quant à la globine, elle représente 95 p. 100 de l'hémoglobine ; son édification suit les règles générales de la synthèse des protéines, synthèse qui se fait aux dépens de catabolites d'origine endogène ou exogène (145, 214, 221, 222). Des études assez dispersées ont fait connaître une prééminance de valeur de certains acides aminés qui ont été classés en trois groupes suivant l'importance de la part qu'ils prennent à la formation de l'hémoglobine (223) :

— le premier comprenant glycocolle, acide aspartique, acide glutamique, cystine, histidine, phénylalanine, proline ;

(*) Consulter à ce sujet « L'anémie », par CHEVALIER (37).

— le second : leucine, méthionine, lysine, tryptophane, tyrosine ;

— le troisième : alanine, valine, isoleucine, arginine.

Enfin, il est évident que la synthèse de l'hémoglobine exige des biocatalyseurs spéciaux. On conçoit donc l'importance du rôle du laboratoire dans le diagnostic des anémies.

L'examen du sang permet de constater une diminution du taux de l'hémoglobine due à la diminution du nombre des hématies ou à celle de la teneur en hémoglobine de ces dernières. Ces deux facteurs peuvent être simultanément en cause, mais, dans certains cas, le sang pauvre en globules renferme des hématies surchargées en hémoglobine. La numération globulaire et le dosage de l'hémoglobine fournissent une donnée précieuse : la valeur globulaire, laquelle, d'après sa définition absolue, est le poids d'hémoglobine contenue dans une hématié (*). Cette donnée permet de classer les anémies en trois catégories : normo, hypo et hyperchromes, selon que la valeur globulaire est comparable, inférieure ou supérieure à la moyenne normale.

Les dimensions et la forme des hématies sont très importantes à considérer, car la manifestation des dysmorphies globulaires est toujours un signe très précoce d'anémie. Chez le sujet normal, tous les érythrocytes ont sensiblement le même diamètre ($7,4\ \mu$ en moyenne). On dit qu'il y a alors isocytose et, dans le cas contraire, anisocytose. Dans cette dernière on peut observer la présence de mégaloctes, c'est-à-dire d'hématies énormes atteignant $12\ \mu$ et plus de diamètre, de macrocytes dont le diamètre est d'environ $10\ \mu$ ou de microcytes (diamètre voisin de $6\ \mu$). Les schizocytes ou très petites hématies de diamètre compris entre 3 et $4\ \mu$ sont rarement observés et on admet qu'ils proviennent de la fragmentation des hématies.

L'anisocytose est de règle et la prédominance d'une forme anormale d'érythrocytes est un caractère important pour la détermination du type d'anémie, laquelle peut être macro ou microcytique.

Le sang de l'homme normal adulte ne contient pas d'hématies nucléées ; celles-ci n'existent que dans la moelle osseuse, mais elles peuvent apparaître dans le sang ; elles témoignent alors d'une hyperactivité de la moelle. Nous préciserons plus loin les caractères des réticulocytes et la signification des variations de leur taux dans le sang.

(*) La valeur globulaire absolue est le plus souvent remplacée en clinique par la valeur globulaire relative, égale à un, chez un sujet normal

Dans la plupart des anémies, la diminution du nombre des hématies va de pair avec celle du nombre des globules blancs et des plaquettes sanguines ; on note un léger excès des éosinophiles dans l'anémie de BIERMER. L'hyperbilirubinémie, lorsqu'elle s'observe, témoigne d'une destruction de l'hémoglobine dont il convient alors de déterminer le siège.

L'examen de la moelle osseuse, prélevée chez l'Homme par ponction sternale, présente un grand intérêt tenant au fait que ce tissu est le lieu de formation des hématies. Le myélogramme traduit les différentes étapes qui conduisent de la cellule indifférenciée à l'érythrocyte adulte. Les précurseurs sont appelés proérythroblastes. Colorés par la méthode de GIEMSA, les proérythroblastes sont des cellules beaucoup plus grosses que les hématies ; leur noyau est très volumineux, coloré en rouge clair et présente un aspect granuleux (chromatine lâche). Le protoplasme, dépourvu d'hémoglobine, et disposé en une couronne étroite autour du noyau, est coloré en bleu pur. Les proérythroblastes évoluent par la suite : les figures de mitose se raréfient ; le protoplasme se colore moins intensément en bleu : sa coloration tend vers le violet. Tels sont les caractères de l'érythroblaste.

L'enrichissement en hémoglobine se poursuivant, on obtient l'érythrocyte nucléé où le noyau n'a plus que 5 μ de diamètre avec une chromatine fortement condensée et colorée en noir violacé. Puis on assiste à la disparition du noyau selon un mécanisme très discuté. La jeune hématie est alors jetée dans le torrent circulatoire où elle continuera à s'enrichir en hémoglobine...

Traitées par les colorants vitaux, les toutes jeunes hématies peuvent présenter un fin réticulum bleu violet (si l'on a employé le crésyl-bleu-brillant), ce qui leur fait donner le nom de réticulocytes ; ceux-ci existent dans le sang au taux de 0,5 à 1 pour 100 des hématies chez les sujets normaux. On les voit apparaître en grand nombre (30 p. 100 des hématies) et transitoirement, chez des anémiques au cours des premiers jours d'un traitement efficace. Cette crise réticulocytaire est un signe général d'hyperactivité de la moelle et de la restauration de l'hématopoïèse par la médication. On ne doit pas pour cela la considérer comme caractéristique de l'efficacité de cette dernière, car bon nombre de substances (*) possèdent la

(*) Il s'agit en général des excitants du système réticuloendothélial.

propriété d'exciter la moelle et de provoquer ainsi une crise réticulocytaire n'ayant aucun rapport avec une action spécifiquement antianémique. Tel est le cas, par exemple, des injections de rouge congo ou de dérivés protéiques et de l'absorption d'arsénite de potassium. Bref, les réticulocytes sont des hématies jeunes dont le protoplasme n'est pas encore saturé d'hémoglobine.

En résumé, on assiste essentiellement dans la moelle à l'apparition des formes primitives ou proérythroblastes dépourvus d'hémoglobine, à la transformation de ces derniers en érythroblastes où se manifestent les premières traces d'hémoglobine. L'évolution se poursuit avec l'érythrocyte nucléé ; la perte du noyau conduit à l'hématie avec, comme terme de passage, le réticulocyte.

On admet que l'érythrocyte normal provient d'une série dite normoblastique et que les formes de l'anisocytose proviennent des séries macro-, mégalo- et microblastiques. C'est dire que, dans les anémies, l'anisocytose se retrouve dans l'examen du myélogramme qui permet de découvrir des mégalo- et des microblastes. Ces signes sont mis à profit pour l'identification de certains types d'anémie ; par exemple, l'anémie de BIERMER est mégaloblastique. Ce rappel de l'histogénèse de l'hématie présente un intérêt qui se manifestera au cours de l'exposé qui suit.

Déjà, nous voyons toute la complexité de l'hématopoïèse, aussi la multiplicité des anémies s'explique-t-elle par le fait que le trouble de l'hématopoïèse peut trouver sa cause dans le dysfonctionnement de l'un ou de plusieurs des nombreux mécanismes qui concourent à la formation des hématies.

NOTIONS GÉNÉRALES SUR LA PHYSIOLOGIE ET SUR LES CAUSES DES ANÉMIES

Dans le même temps que la pathologie prenait pour coordonner les différents signes des anémies, il appartenait aux physiologistes d'en définir le mécanisme et les causes. Un bref rappel des résultats obtenus nous paraît devoir servir d'introduction à l'étude des principes antianémiques.

Les anémies non pernicieuses relèvent de causes multiples. La présence du fer dans l'hémoglobine a permis de penser que la carence en ce métal ou des troubles de son

métabolisme pouvaient être la cause d'anémies. Cette hypothèse s'est révélée expérimentalement exacte. Une alimentation très pauvre en fer, comme le régime lacté, rend les animaux anémiques. Cliniquement, certains sels de fer sont des médicaments efficaces dans la plupart des anémies hypochromes microcytiques telles que la chlorose ; mais ils demeurent sans effet ou bien se bornent au rôle d'adjuvant dans tous les autres cas.

L'hémoglobine étant une protéine, il était logique de penser qu'une carence azotée ou des troubles du métabolisme des protides peuvent être la cause de l'anémie. Cette hypothèse a trouvé une confirmation immédiate dans l'existence d'anémies consécutives au jeûne prolongé ou à une alimentation pauvre en azote. La guérison survient rapidement lorsque le sujet est soumis à une alimentation riche et variée, à la condition toutefois que l'inanition prolongée ne l'ait pas conduit à une misère physiologique telle que toute réparation azotée soit devenue impossible ; la thérapeutique par les acides aminés hématogènes est basée sur ces considérations (46, 86, 161, 220). Le problème devient d'une étude plus délicate sous l'angle des troubles du métabolisme protidique. De nombreux facteurs entrent alors en jeu. Des troubles digestifs peuvent d'abord être en cause. La résorption des acides aminés indispensables à la synthèse de l'hémoglobine peut être altérée. Les gastro-entérites graves provoquent l'anémie et celle-ci disparaît avec elles. Par ailleurs, l'utilisation normale des protides n'est assurée qu'en présence des vitamines du groupe B. Aussi la carence en la plupart de ces dernières est-elle suivie d'anémies.

Les anémies sont donc dues à la carence en matériel ou en biocatalyseur (fer, protides, vitamines) nécessaires à la synthèse de l'hémoglobine. Le problème de la recherche des causes des anémies n'en est pas entièrement résolu pour cela, puisque celles-ci peuvent survenir indépendamment de ces états de carence comme tel est le cas de l'anémie pernicieuse de BIERMER. Il est vrai que celle-ci s'accompagne de troubles gastriques, aussi bien avant qu'après injection d'histamine. Néanmoins, la digestion des protéines reste alors possible et satisfaisante grâce à l'activité pancréatique et intestinale qui est alors conservée et le biermérien ne présente pas de troubles généraux du métabolisme des protides.

Mais les phénomènes gastriques sont alors trop nets pour ne pas avoir retenu l'attention des chercheurs. C'est ainsi que CASTLE et ses collaborateurs (32, 33) ont été amenés à leur classique expérience qui met en évidence le rôle de la sécrétion gastrique. En faisant ingérer simultanément à un biermérien du suc gastrique d'un sujet normal et de la viande, on obtient une nette amélioration de l'état du malade en quelques jours. L'incubation préalable du suc gastrique et de la viande ne permet pas d'obtenir des résultats sensiblement meilleurs. L'ingestion de suc gastrique seul ou de viande seule est sans effet. D'après CASTLE, le suc gastrique normal apporte un « facteur intrinsèque » et la viande « un facteur extrinsèque ». La présence simultanée de l'un et de l'autre est indispensable pour que prenne naissance un principe spécifiquement antipernicieux. Nous discuterons plus loin de la nature de ce dernier, mais nous retiendrons, d'ores et déjà, que l'anémie de BIERMER ne doit pas être attribuée à une carence alimentaire, mais bien à l'impuissance où se trouve le malade d'élaborer un principe indispensable à une hématopoïèse normale. Par cela même, le principe antipernicieux paraît être une hormone.

La question se pose donc de l'existence d'un principe hématopoïétique et cela avec d'autant plus d'opportunité que le foie (ou les extraits hépatiques) ont une activité spécifique dans le traitement de l'anémie pernicieuse. Comme on le verra, le principe antipernicieux de CASTLE, et celui présent dans le foie, ne sont pas identiques. Cependant, rien n'empêche de penser que le dernier est élaboré par le foie à partir du premier, le foie des biermériens étant dépourvu de principe antipernicieux, son extrait étant totalement inactif.

On doit donc admettre que le foie sécrète une hormone hématopoïétique et considérer comme probable que cette dernière résulte de la transformation d'un précurseur provenant lui-même de l'action du suc gastrique (facteur intrinsèque) sur certains aliments protidiques (facteur extrinsèque). Le mécanisme d'action de cette hormone hépatique a été précisé par l'étude de l'état créé par sa déficience : l'anémie pernicieuse de BIERMER. Aussi est-il utile de rappeler les différents signes qui la caractérisent.

L'anémie pernicieuse d'ADDISON-BIERMER, non traitée, est mortelle dans un délai d'environ trois ans. Elle atteint

préférentiellement les sujets des races nordiques, âgés de 40 à 50 ans et dont la chevelure a prématurément blanchi. C'est souvent une maladie familiale qui passe inaperçue tant que le taux de l'hémoglobine demeure supérieur à 65 p. 100. Les signes gastro-intestinaux sont les premiers à se manifester : la langue est vernissée, décapillée ; ces modifications s'étendent à l'œsophage et à l'estomac où l'on voit apparaître des plaques dégénératives. Le suc gastrique est achlorhydrique et le demeure après l'épreuve à l'histamine. Des souffles cardiaques organiques sont fréquents. Les troubles nerveux se manifestent le plus tardivement par des paresthésies des mains, des pieds et des altérations plus ou moins sévères des cordons postérieurs et latéraux de la moelle. Le délire et l'agitation extrême sont fréquents à la période terminale.

On constate dans le sang la diminution du nombre des hématies, des globules blancs et des plaquettes. Il s'agit d'une anémie hyperchrome. L'anisocytose est très marquée avec prédominance de macrocytes. Les réticulocytes sont très rares et l'on rencontre quelques hématies nucléées. On note une légère éosinophilie des globules blancs. L'hyperbilirubinémie est très fréquente.

La moelle osseuse est hyperplasique : elle envahit l'os aux dépens des lipides qui disparaissent. Cette moelle rouge est caractérisée par l'extrême abondance des éléments primitifs ou proérythroblastes, appartenant surtout à la lignée mégaloblastique. Par contraste, la rareté des érythroblastes est frappante. L'hyperplasie de la moelle est d'autant plus intense que l'appauvrissement du sang en globules est plus grand.

Ainsi, on se trouve devant un fait paradoxal : l'existence simultanée d'une moelle hyperplasique et de l'anémie. Le paradoxe n'est qu'apparent : la moelle répond, en fait, à un stimulus naturel. Ce dernier n'est pas autre chose que l'anoxémie, car, en fin de compte, la diminution de la capacité respiratoire déclenche l'activité de la moelle. En cela, la réponse du biermérien doit être considérée comme physiologique (*).

Quant au phénomène pathologique, il se manifeste essentiellement par la suspension de la transformation des proérythroblastes en érythroblastes. Là est l'hiatus dans le cycle de l'hématopoïèse chez le biermérien. D'ailleurs, quand on administre du foie au malade, on voit rapidement

(*) Cette hyperplasie est considérée par CHEVALIER (37) comme un état inflammatoire de la moelle. Ceci ne peut être admis que dans la mesure où tout stimulus trop longtemps prolongé, crée une exagération de la réponse attendue et, enfin, une irritation de l'organe intéressé.

évoluer les formes primitives en érythroblastes et le myélogramme prendre un aspect normal. Dès les premiers jours du traitement, la moelle expulse en masse, hâtivement, les produits de cette transformation des proérythroblastes qu'elle avait accumulés ; aussi le sang est-il à ce moment particulièrement riche en hématies jeunes, donc pauvre en hémoglobine. La valeur globulaire s'abaisse alors malgré l'augmentation du nombre des hématies et il se produit une crise réticulocytaire d'autant plus intense que le nombre des érythrocytes était initialement plus bas (loi de MINOT et MURPHY [135]).

En résumé, le facteur hépatique a pour rôle de déclencher et de régler la transformation des proérythroblastes en érythroblastes. Cette phase de l'hématopoïèse coïncide avec l'apparition de l'hémoglobine au sein des éléments de la lignée rouge.

Au cours du traitement par les extraits hépatiques, les autres signes cliniques évoluent en règle générale vers une amélioration. L'hyperbilirubinémie diminue assez rapidement jusqu'au taux normal et, simultanément, on constate une importante élimination de pigments biliaires par les urines et les fèces. Il est à remarquer que cette débâcle transitoire de pigments ne peut pas s'expliquer uniquement par une augmentation de la destruction des hématies : un simple bilan relatif à un individu ayant 1×10^6 globules rouges par mm^3 de sang, montre qu'il faudrait, pour que cette explication soit satisfaisante, que les hématies soient détruites 15 fois plus vite que normalement, ce qui serait incompatible avec la vie. Il vaut mieux, à défaut d'autre explication, admettre qu'il s'agit d'un trouble du métabolisme de ces pigments et que l'excès éliminé alors ne dérive pas de la destruction des globules rouges. L'augmentation passagère de l'élimination d'uro- et de coproporphyrine, constatée par DOBRINER et RHOADS (60) chez les biermériens au début du traitement, est à rapprocher des observations précédentes. Ces faits mettent en évidence l'importance des troubles de la synthèse et de la destruction de l'hémoglobine au cours de la maladie de BIERMER. Il est regrettable qu'ils n'aient pas davantage attiré l'attention des chercheurs.

Les troubles gastriques les plus apparents régressent sous l'influence de l'hépatothérapie : la langue reprend son aspect normal, les nausées et la diarrhée disparaissent ;

l'appétit revient et cependant le suc gastrique demeure achlorhydrique. La cause essentielle de l'anémie n'est donc pas modifiée. Les souffles cardiaques s'évanouissent. Les troubles nerveux s'amendent mais les lésions nerveuses restent acquises ; elles sont seulement arrêtées dans leur évolution (*). Les globules blancs et les plaquettes augmentent et, au début du traitement par le foie, on note une nette éosinophilie.

La guérison n'est jamais définitive ; les rechutes sont de règle et surviennent parfois après de longs intervalles de rémission. L'hépathothérapie doit donc être poursuivie sans interruption totale : elle est au biernérien ce que l'insuline est au diabétique.

En résumé, les mécanismes de production des anémies sont extrêmement divers en raison de la complexité de l'hématopoïèse. La thérapeutique doit distinguer les médicaments antianémiques actifs contre diverses anémies sauf contre celle de BIERMER et les médicaments antipernicieux, spécifiques de cette dernière.

II. — TESTS D'ACTIVITE DES PRODUITS ANTI-ANEMIQES ET ANTIPERNICIEUX

On conçoit, à la lumière des faits résumés plus haut, que les recherches entreprises pour l'isolement des facteurs anti-anémiques aient suivi deux voies essentiellement différentes. Certains se sont attachés à extraire des substances analogues aux vitamines, d'autres ont abordé le problème dans le but d'isoler une hormone. Cette divergence au départ s'explique par la pluralité des anémies. Elle risque de faire confondre les actions anti-anémiques et antipernicieuses. Quoi qu'il en soit, de telles recherches ne peuvent être poursuivies avec fruit qu'à la condition de disposer de tests permettant de préciser l'activité du matériel biologique mis en œuvre. Le test des anti-anémiques n'exige pas un caractère de spécificité très strict ; il suffit en effet de provoquer une anémie quelconque chez un animal pour disposer d'un témoin utile. Par contre, l'essai des produits antipernicieux pose un problème de pathologie expérimentale : reproduire chez l'animal une anémie identique à celle d'ADDISON-BIERMER.

(*) Les fonctions du cylindraxe peuvent cependant se restaurer si le traitement a été suffisamment précoce et à condition qu'il n'ait pas été complètement détruit (DAVISON, 52).

Comme nous le verrons, le problème n'a pas reçu de solution définitive et les anémies expérimentales ne se rapprochent jamais que par un nombre restreint de caractères de l'anémie de BIERMER. L'examen critique des différents procédés utilisés pour réaliser des anémies permet seul de dégager les principales règles susceptibles de justifier le choix du test biologique pouvant être considéré comme le plus satisfaisant pour la caractérisation et le titrage de l'activité des produits antipernicieux capables de combattre efficacement l'anémie d'ADDISON-BIERMER.

LES ANÉMIES EXPÉRIMENTALES ET LES TESTS D'ACTIVITÉ DES PRINCIPES ANTI-ANÉMIQUES

Il est possible d'instaurer un état d'anémie chez l'animal par des moyens procédant de mécanismes très différents. On peut provoquer une destruction rapide des hématies ou s'opposer au renouvellement normal des globules rouges par les organes hématopoïétiques. On obtient également des anémies expérimentales en privant l'animal des métabolites nécessaires à l'édification des érythrocytes. Il y a donc lieu de considérer les anémies par destruction et les anémies par carence.

1° Anémies par destruction.

L'action destructrice qu'exercent les rayons X et les corps radio-actifs vis-à-vis des hématies et des organes hématopoïétiques est bien connue. A la suite de l'exposition des cobayes aux rayons X, BENDA (11) a obtenu une anémie peu durable. Par des injections de sels de thorium et d'ionium, LAMBIN et CORNIL (121) réalisent chez le Lapin une anémie mortelle au bout d'environ quatre mois, tandis qu'ARTHUS, LOURAU et de SACY (3) montrent l'inconstance de l'action du mésothorium chez le même animal.

Les anémies résultant de l'intoxication par diverses substances chimiques sont infiniment plus accessibles à l'expérimentation. En effet, certains produits provoquent l'hémolyse (par exemple l'eau distillée en injections intra-veineuses, les sérums toxiques, les venins de serpents, les acides biliaires...), d'autres sont méthémoglobinisants (par exemple : les chlorates, les nitrites, les phénols, les amines aromatiques...). L'administration de toxines bactériennes peut être cause d'anémies.

L'effet anémiant de certains corps doit être rapporté à leur action de blocage du système réticulo-endothélial, donc de la moelle osseuse, comme tel est le cas pour divers colloïdes (collargol, encre de Chine, rouge Congo). Parmi toutes ces substances, il en est peu qui aient été retenues dans le but expérimental qui nous intéresse, ce sont essentiellement : les sels de plomb, la phénylhydrazine, l'hydroxylamine, les acides gras non saturés et la saponine soit seule, soit associée à l'argent colloïdal (collargol).

L'anémie est une manifestation bien connue de l'intoxication chronique par les sels de plomb. Elle a été reproduite expérimentalement par SABRAZES (165) et par SCHMIDT (167). Elle est caractérisée par une importante érythrolyse simultanée à un blocage partiel de moelle osseuse, elle va de pair avec une porphyrinémie et de la porphyrinurie. Cette anémie est guérie par le foie. On doit à ARTHUS (3) l'étude minutieuse des conditions permettant d'obtenir chez le Lapin une anémie stable et durable par intoxication plombique. A la suite d'injections quotidiennes de 1 mg. de plomb, l'anémie apparaît au bout de deux à trois semaines, marquée par une chute de 1 à 2 millions du nombre des hématies par mm³ de sang et par une baisse de 20 à 25 p. 100 du taux d'hémoglobine. Cette anémie hypochrome persiste près de trois mois après l'arrêt des injections de sels de plomb. L'activité des produits anti-anémiques se manifeste par un retour à l'état normal en quinze ou vingt jours alors que la rémission spontanée de l'anémie exige au moins deux mois. Tout récemment, M. LOURAU (128) a montré que l'injection de produits antipernicieux à des lapins anémiés par le plomb provoque une chute importante et rapide de la valeur globulaire chez ces animaux. Cet auteur propose de baser sur ce principe une technique de dosage dont la précision serait de l'ordre de 1 p. 100, ce qui est exceptionnel pour un titrage biologique. Il faut cependant noter que l'anémie au plomb est très éloignée par ses caractères de la maladie de BIERMER.

La phénylhydrazine possède une action destructive des hématies mise en évidence par HOPPE-SEYLER (97) chez le Lapin. KAMINER et ROHNSTEIN (111) ont étudié l'anémie consécutive à des injections quotidiennes de 0,01 g. de phénylhydrazine au Lapin, se manifestant au bout d'une dizaine de jours. Ils ont observé la présence de mégalo-

blastes et d'hématies jeunes à granulations basophiles. Mais, dès l'arrêt des injections toxiques, l'animal guérit, ce qui nous éloigne de l'évolution fatale de l'anémie pernicieuse humaine. FIESSINGER et LAUR (72) insistent sur l'importance de la réticulocytose des animaux intoxiqués à la phénylhydrazine. Cette hyper-réticulocytose va d'ailleurs de pair avec une baisse marquée de la valeur globulaire, aussi RUYSNIACK et ENGEL (164) ont-ils proposé comme test d'activité le retard apporté à la chute de la valeur globulaire consécutive à une injection unique de phénylhydrazine chez le Chien. ERDOES (68) attache une grande valeur à cette technique et propose de définir l'unité biologique comme la dose capable de supprimer toute baisse de la valeur globulaire après injection de 0,01 g. de phénylhydrazine. Cette méthode est fort séduisante a priori, mais on peut difficilement admettre que les troubles sanguins, fort passagers, notés à la suite d'une seule injection de phénylhydrazine méritent d'être considérés comme traduisant une véritable anémie : la moelle n'est alors pas atteinte et la régénération globulaire survient trop rapidement. En fait, il s'agit d'un simple incident toxique. Par ailleurs, le retard apporté à la chute de la valeur globulaire, souvent très faible et fort variable pour un même produit, n'est pas toujours très net. Quant à la spécificité de cette méthode, elle mériterait d'être examinée de plus près, surtout en ce qui concerne le mode d'action de la phénylhydrazine.

Les acides gras non saturés sont anémiant, ainsi qu'il résulte des travaux de FAUST et TALLQUIST (70), qui ont démontré que l'anémie botriocéphalique est due à la présence de ces corps parmi les lipides du parasite. Pour-suivant ses recherches avec SCHMICKE (71), FAUST met en évidence que cette propriété n'est pas spécifique des acides gras du botriocéphale mais qu'elle s'étend aux différents acides gras polyéthyléniques dont l'injection, sous forme de savons, provoque une anémie hyperchrome, très pernicieuse. Le fait est confirmé par BRICKMANN et SZENT-GYORGYI (20) puis par GOTTLEBE (84). Les animaux anémiés par ce procédé réagissent vis-à-vis des extraits hépatiques par une intense crise réticulocytaire et une érythrocytose plus rapide que la régénération de l'hémoglobine, si bien que l'on observe une chute importante de la valeur globulaire. Ces différents caractères constitueraient de très

intéressants éléments pour un test biologique si cette anémie expérimentale n'exigeait pas de très fortes doses de foie pour guérir. Il y a là un inconvénient majeur qui enlève à ce test toute sensibilité et le rend impropre à des déterminations quantitatives. Son emploi se limite à des essais qualitatifs.

Les saponines hydrolysent in vitro et in vivo le sang des Mammifères. BUNTING (28) obtient des lapins très anémiques après des injections répétées de saponine. D'après ISAAC et MOCKEL (103), l'ablation de la rate s'opposerait à l'apparition d'une telle anémie, mais ce fait est infirmé par FIRKET (74) et par BACKMANN (7). UCKO (206), puis JASTROWITZ et NEIDHART (107) essaient l'action des extraits hépatiques sur les animaux anémiés par la saponine ; ils observent une crise réticulocytaire mais le nombre des hématies n'est pas augmenté. PASCHKIS et TAYLOR (147) signalent que les injections d'extraits de foie possèdent une action prophylactique contre celle de la saponine faite simultanément. Malheureusement, tous ces résultats sont fortement controversés par GOTTLIBE (84) qui insiste sur les faits suivants : d'une part l'anémie rétrocede dès qu'on cesse l'administration de la saponine et, d'autre part, le foie n'agit ni curativement ni préventivement, contrairement aux assertions précédentes. GOTTLIBE préconise d'associer la saponine au collargol, mais SCHABEL et BARENTHOR (166) ne considèrent pas cette modification comme réellement avantageuse.

Certaines toxines bactériennes ont été utilisées pour provoquer des anémies. En effet, HURST (98) pense que dans l'anémie de BIERMER, l'achylie supprime, dans l'intestin, l'action antiseptique du suc gastrique, il en résulterait la prolifération d'espèces bactériennes (*B. perforans*, *B. coli*, *Streptococcus*...) dont les toxines, résorbées, provoqueraient les troubles de l'hématopoïèse. Les résultats ont été irréguliers : GOTTLIBE (84) n'obtient qu'une anémie peu intense, légèrement hyperchrome avec de fortes, et par conséquent dangereuses, doses de toxines. L'emploi de la toxine typhoïdique, préconisé par WOLF, WEBER et KROGER a été critiqué par CRESKOFF et FITZ-HUGH (44) qui ne relèvent pas d'effet thérapeutique régulier du foie. D'ailleurs, DAVIDSON (53) a montré qu'après guérison de l'anémie par l'hépatothérapie la flore intestinale reste le plus souvent inchangée. Aussi considère-t-on aujourd'hui

que cette dernière ne joue qu'un rôle secondaire dans l'anémie de BIERMER. Cela enlève beaucoup d'intérêt aux méthodes ci-dessus.

La gastrectomie totale ou l'ablation du pylore et de la région duodénale riche en glandes de Brunner, est suivie d'anémie. On a pu obtenir ainsi chez le Porc des anémies du type de celle de BIERMER, deux ou trois ans après l'intervention (BENCE [10], WATTERMANN, KOHV et HIRSCHFELD [213]). La réussite dépend évidemment de la certitude que l'on peut avoir de la totalité de l'ablation des glandes de Brunner. Il est certain que cette technique est celle qui permet d'obtenir une anémie pratiquement identique à celle de BIERMER, puisque dans les deux cas, elle est déclenchée par la même cause, à savoir la suppression de l'activité des glandes de Brunner. Mais on conçoit que l'expérimentation exige vraiment beaucoup trop de temps pour que ce procédé puisse être à la base d'un test commode et facilement accessible.

Les anémies par destruction ne permettent donc pas de réaliser un état pathologique comparable à l'anémie de BIERMER exception faite de la gastrectomie ; mais ce dernier procédé, par la lenteur de l'évolution de l'anémie, ne se prête pas à une application pratique.

2° Anémies par soustraction ou par carence.

Des hémorragies répétées conduisent à des anémies selon un mécanisme qui se rapproche le plus des phénomènes physiologiques de l'hématopoïèse. WHIPPLE, puis FONTES et THIVOLLE ont réalisé chez le Chien ce type d'expérience qui nécessite beaucoup de temps et de soin.

Des régimes diversement carencés permettent d'obtenir des animaux anémiques. L'alimentation uniquement lactée est dans ce cas ; elle a été mise en œuvre par ELVEHJEM (69), BÉARD (8). Ces auteurs ont utilisé du lait de vache dans l'alimentation prolongée des jeunes rats. Ils obtiennent ainsi une anémie hypochrome du type chlorose à la condition d'éloigner toutes les poussières métalliques. Les animaux ainsi préparés sont d'excellents réactifs pour l'étude du rôle des ions métalliques dans la régénération de l'hémoglobine. Des expériences du même type, réalisées avec du lait de chèvre, conduisent à une anémie hyperchrome, à réticulocytose élevée, réfractaire à l'action du fer et du cuivre mais curable par les extraits de foie

(ROMINGER et BOMSKOV 162). Ces résultats sont discutés et plusieurs auteurs déclarent n'avoir obtenu avec le lait de chèvre qu'une anémie hypochrome semblable à celle donnée par le lait de vache.

Nous n'insisterons pas sur les anémies qui peuvent accompagner secondairement les carences en vitamines du groupe B. En effet, on trouvera, d'une part, des données classiques dans la littérature de ces dernières et, d'autre part, nous aurons l'occasion dans la suite de cet article de souligner l'importance de ce type d'anémie.

On sait que l'inanition protéique conduit à l'anémie. En particulier le comportement des rats blancs soumis à l'inanition protéique a fait l'objet d'études très étendues (TERROINE A. et J. ROCHE) au cours desquelles les auteurs ne se sont pas intéressés aux modifications des éléments figurés du sang. Le récent travail d'ASCHKENASY (4) apporte la première contribution précise à la connaissance de l'anémie expérimentale par inanition protéique provoquée chez le Rat. Cet auteur obtient ainsi une anémie hypochrome et il montre, par la suite, qu'un excès de vitamine B, loin de s'opposer à l'évolution de l'anémie, a pour résultat de l'aggraver.

Nous avons également étudié l'anémie consécutive à l'inanition azotée (62). Nous aurons l'occasion de voir que l'anémie obtenue est très intense et de caractère hyperchrome.

Les anémies par soustractions présentent, du point de vue théorique, des avantages remarquables par rapport aux anémies par destruction. Du point de vue pratique, elles ne sont guère plus commodes et plus accessibles que ces dernières en ce qui concerne leur mise en œuvre pour caractériser et titrer l'activité du principe antipernicieux. La recherche d'un test répondant à de tels desiderata, et par ailleurs spécifique, demeure donc à l'ordre du jour. Néanmoins, nous pensons que l'anémie expérimentale provoquée par l'inanition azotée est le guide le plus sûr et le plus facilement accessible dont on dispose à l'heure actuelle dans les recherches du principe antipernicieux. Son emploi doit être réservé aux essais d'extraits hautement purifiés de façon à être à l'abri des réactions parasites de substances sans rapport avec lui.

Devant ces difficultés, la pharmacopée américaine s'est résignée à adopter comme unité biologique de l'activité antipernicieuse la dose minima d'extrait capable de provoquer une nette crise réticulocytaire chez le biermérien. Cet essai a été introduit dans la XI^e Révision de la Pharmacopée des Etats-Unis (1936), maintenu et précisé dans la XII^e Révision (1942), XIII^e Révision (1947) et XIV^e Révision (1950) (196). D'autre part, une commission de contrôle (the U.S. Pharmacopeia Antianemia Preparations Advisory Board) fonctionne régulièrement. Elle fixe, après examen des dossiers d'expertise, la teneur en unités anti-anémiques des préparations essayées. L'unité U.S.P. (United States Pharmacopeia) est la plus petite quantité de substances qui, donnée journellement pendant quinze jours à un biermérien, produit une réponse hématopoïétique satisfaisante (poussée réticulocytaire - augmentation du nombre des hématies et de l'hémoglobine). Le problème est ainsi résolu avec le maximum de sécurité pour la santé publique ; il ne l'est pas d'une façon pratique, en ce qui concerne les travaux de laboratoires de recherches et de l'industrie.

III. — LES PRINCIPES ANTI-ANEMIKES DANS LE GROUPE DES VITAMINES B

Le fait que certaines anémies, dites secondaires, sont le résultat de carences alimentaires, justifie les recherches qui ont été entreprises dans le but d'isoler les facteurs anti-anémiques dans le groupe, encore important, des vitamines inconnues.

Le foie et la levure de bière ayant été reconnus comme possédant des propriétés anti-anémiques, L. WILLS (229) entreprend les premières études précises à leur sujet. Elles démontrent l'activité de la levure dans l'anémie macrocytique de la grossesse, très fréquente dans l'Inde, et l'inefficacité des extraits de foie dans la même affection. Avec BILMORIA (232), elle poursuit ses expériences sur le Singe. Ces travaux sont confirmés par DAY et ses collaborateurs (57) et d'autres chercheurs (152, 215). L'expérimentation sur l'Homme et sur le Singe s'avère trop longue pour permettre d'importants progrès en ce qui concerne la

concentration des facteurs actifs ainsi mis en évidence. Leurs successeurs trouveront des méthodes de travail plus rapides et plus fécondes en utilisant l'anémie de carence alimentaire du Poulet et les techniques basées sur l'observation de la croissance des micro-organismes en présence des produits de leurs essais d'extraction.

SNELL et PETERSON (179) montrent que le charbon agissant sur des extraits bruts de levure ou de foie, adsorbe des principes indispensables à la croissance du *Lactobacillus casei* cultivé sur un hydrolysât de caséine. La fraction active obtenue après élution est désignée sous le terme de « Norit eluate factor » ; elle est distincte des facteurs de croissance déjà connus tels que la riboflavine, l'acide pantothénique, l'acide nicotinique ou la biotine. La préparation la plus pure se montre active à la dose de 0,055 µg pour un cm³ de milieu de culture dans des conditions d'expériences. HUTCHING BOHONOS et PETERSON (99, 100) obtiennent un « Norit eluate factor » 200 fois plus actif et ils montrent qu'il est, en outre, indispensable à la croissance du Poulet. Le « Norit eluate factor » est également indispensable à la croissance du *Lactobacillus delbrückii*, du *Propionibacterium pentosaceum* et du *Streptococcus lactis* R. (99).

MITCHELL. SNELL et WILLIAMS (138) appliquent cette méthode d'adsorption sur charbon à des extraits d'épinards qui se révèlent contenir un facteur très actif sur la croissance du *S. lactis* (129), du *L. casei* et d'autres micro-organismes voisins. Les auteurs poussent la purification aussi loin que possible (81, 139, 140) et, pour un produit d'une très haute activité, proposent la formule brute suivante : C₁₅ H₁₅ O₈ N₅ Celui-ci présente une fluorescence dont l'intensité est proportionnelle à l'activité biologique. La substance, baptisée du nom d'acide folique, est considérée comme le principe actif essentiel du « Norit eluate factor » (99).

Les recherches de cette nature se multiplient. STOKSTAD (190) poursuit son travail sur le foie et sur la levure et met en évidence un facteur analogue au précédent (*L. casei* factor - STOKSTAD). KERESZTESY, RICKES et STOKES (114) montrent que la croissance du *Streptococcus lactis* R. est plus spécifiquement stimulée par un facteur qu'ils désignent sous le terme de « S.L.R. factor ». L'étude de ce facteur se

ramène cependant à l'observation de l'activité biologique de l'acide folique.

La vitamine Bc sera découverte par une voie toute différente. HOGAN et PARROTT (94) mettent d'abord au point un régime anémiant pour le Poulet. L'anémie qui se manifeste est du type hyperchrome macrocytique (144). Puis ces auteurs montrent l'existence d'un facteur, appelé vitamine Bc, adsorbable sur la terre à foulon ou le charbon et capable de prévenir et de guérir cette anémie. MILLS, BRIGGS, ELVEHJEM et HART (131) suggèrent aussitôt que la vitamine Bc est identique au « Norit eluate factor » (94). PFIFFNER et ses collaborateurs (152) isolent du foie un produit cristallisé à la fois doué d'activité anti-anémique chez le Poulet et accélérant la croissance des micro-organismes. Ils le désignent également sous le nom de vitamine Bc. Ils en donnent la composition centésimale et décrivent ses propriétés, ils étudient plus particulièrement son spectre dans l'ultra-violet à différents pH ; enfin son activité sur le développement des cocci étudiés est du même ordre de grandeur que celle de l'acide folique. A l'examen de ces résultats, la vitamine Bc se révèle identique à l'acide folique.

CAMPBELL, BROWN et EMMETT (29) montrent que la déficience en vitamine Bc dans le régime du Poulet entrave le développement du plumage, retarde le gain de poids et provoque une anémie hypochrome microcytique. Ils signalent également l'abaissement du nombre des leucocytes et des thrombocytes. Ils estiment que la ration doit contenir 100 µg. de vitamine Bc pour que la croissance soit normale et que 40 µg. suffisent pour éviter les signes d'anémie. La vitamine Bc est, d'après eux, aussi active par voie orale que par voie sous-cutanée. BRIGGS (22) obtient des résultats identiques avec un extrait d'épinards riche en acide folique.

Un point particulier reste à éclaircir : la levure donne des extraits actifs sur l'anémie du Poulet mais très peu actifs sur le développement des cultures de *L. casei* ou de *S. lactis* R. BIRD et ses élèves (16) ne tardent pas à montrer que l'activité sur la croissance des micro-organismes apparaît très intense, après digestion des extraits de levure au contact du tissu rénal. Ces observations s'interprètent aisément si l'on admet que, dans la levure, la vitamine Bc existe sous forme de combinaison et que sa libération

résulte d'une action enzymatique. BINKLEY et ses élèves (15) confirment ce point de vue en isolant la vitamine Bc d'un extrait de levure après digestion diastasique. La combinaison où se trouve engagée la vitamine Bc n'est pas de nature protéique : elle est dialysable. Le foie contient également de la vitamine Bc conjuguée. PFIFFNER et ses collaborateurs (151) aboutissent à des conclusions du même ordre et donnent la composition centésimale de la vitamine Bc conjuguée qu'ils ont obtenue cristallisée. Le spectre ultra-violet de la substance qu'ils ont isolée présente les plus grandes analogies avec celui de la vitamine Bc ; les valeurs des absorptions maxima se situent sur les mêmes longueurs d'onde, mais sont, pour des concentrations égales, inférieures à celles de la vitamine Bc. L'activité de cette vitamine Bc conjuguée sur la croissance du *L. casei* est telle que 1 µg. équivaut seulement à 0,003 à 0,006 µg. de vitamine Bc libre ; mais, après action du rein autolysé il apparaît une activité identique à celle que l'on peut prévoir d'après l'intensité de l'absorption observée par l'examen du spectre ultra-violet de la vitamine Bc conjuguée. Cette détermination permet en effet de calculer la quantité de vitamine Bc libre présente dans la forme conjuguée. Enfin, l'action prophylactique de la vitamine Bc conjuguée sur l'anémie du Poulet est bien en accord avec celle prévisible par le dosage spectrophotométrique (29, 30).

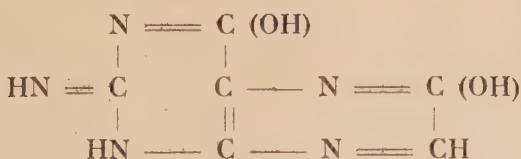
L'existence de la vitamine Bc sous forme conjuguée dans la levure et le foie explique les échecs signalés par WILLS (229, 230, 231) au cours du traitement de l'anémie tropicale de la grossesse par des extraits de foie très purifiés. Dans ces derniers, la vitamine Bc conjuguée était absente. Par contre la levure, pauvre en vitamine Bc libre mais riche en forme conjuguée, se montre spécifiquement active, dans cette affection, par voie buccale.

L'enzyme capable de libérer la vitamine Bc de sa combinaison a reçu le nom de vitamine —Bc— conjugase (16) ; il est présent dans la plupart des tissus animaux, la moelle osseuse y comprise. Le foie, le rein, l'intestin de Porc et le pancréas de Poulet en sont particulièrement riches (16, 54, 133) ; on le rencontre aussi dans les pommes de terre et les amandes. Dans les organes frais, son action est plus ou moins inhibée (16) par des facteurs encore inconnus et elle n'apparaît qu'après autolyse des tissus. Son pH optimum d'action est au voisinage de 4,7. Cet enzyme ne

peut être identifié à aucune des protéases, des nucléases, des phosphatases ou des glucidases connues (16). On a décrit sa préparation à partir du rein de Porc (16) et du pancréas de Poulet (123, 132). Il n'existe aucun travail sur les rapports de cet enzyme avec l'hématopoïèse.

Cependant, il n'est pas prouvé que la vitamine Bc ou acide folique soit l'unique constituant du « Norit eluate factor ». BRIGGS, LUCKEY, ELVEHJEM et HART (21) s'efforcent de démontrer que ce dernier contient deux autres facteurs : les vitamines B₁₀ et B₁₁. On peut retenir l'existence de la vitamine B₁₁ en raison de son action spécifique sur le plumage, par contre la vitamine B₁₀ n'est vraisemblablement pas autre chose que la vitamine Bc conjuguée (29, 30, 241). Les travaux ayant amené à considérer les facteurs R et S (92, 116, 156, 168, 169) et le facteur U (188, 189) n'apportent pas de preuve formelle de leur individualité ; au contraire, ils contribuent à montrer qu'il s'agit, une fois encore, de substances étroitement apparentées à l'acide folique. Enfin, le facteur M est d'abord signalé en raison de son activité dans l'anémie, activité observée par WILLS et STEWARD (228) chez le Singe soumis à un régime constitué par : riz poli 40 g., margarine 15 g., pain blanc 45 g., huile de foie de morue 3 cm³, tomates ou carottes 25 g. Le facteur M est présent dans la levure, les extraits de foie (fraction G de Cohn) (122). La suite des travaux effectués sur cet hypothétique facteur M (42, 54, 55, 56, 57, 99, 133, 200, 201, 202, 203, 212, 234) apporte la démonstration qu'il doit être identifié à la vitamine Bc conjuguée.

Il convient de résumer ici les travaux ayant mis en évidence le rôle des ptérines dans l'hématopoïèse en raison de l'influence considérable qu'ils ont eue sur l'établissement de la structure de l'acide folique. La xanthoptérine, découverte par HOPKINS (96) dès 1889 parmi les pigments jaunes des ailes de Papillon, a été obtenue par synthèse par WIELAND et ses élèves (154, 218, 219). Elle répond à la structure ci-dessous :



Xanthoptérine

Elle est présente aux taux de 1.10 " dans l'urine. Dès 1936 TSCHESCHE et WOLF (205) annoncent que la xanthoptérine à la dose de 10 µg. par jour provoque une augmentation du nombre des hématies chez les rats anémiés par un régime constitué uniquement du lait de Chèvre. Le fait est confirmé par de nombreux travaux (143, 153, 162, 175, 202, 204, 205) et controversé par d'autres (6, 48, 155, 240). POLONOVSKI et ses élèves apportent d'intéressantes contributions à la biochimie des ptérines. CASTLE montre que la xanthoptérine est sans effet sur l'anémie de BIERMER (34). Mais le fait le plus important pour la question qui nous intéresse réside dans les analogies des spectres ultra-violetes de la xanthoptérine et de l'acide folique ou vitamine Bc (MITCHELL [137], BLOOM et ses collaborateurs [17]). A la suite de l'examen de ces spectres on est amené à conclure à la présence d'un constituant du type des ptérines dans la molécule d'acide folique. ANGIER et ses élèves (2) apportent une confirmation éclatante de cette dernière hypothèse en établissant la structure de l'acide folique et en réalisant sa synthèse. L'acide folique répond à la formule ci-dessous :



Acide folique ou ptéroylglutamique

On voit que l'acide folique résulte de l'union d'une ptérine, de l'acide p. aminobenzoïque et de l'acide glutamique. On le désigne dès lors sous le nom d'acide ptéroylglutamique.

L'acide folique de synthèse, comparé à la vitamine Bc cristallisée extraite du foie ou de la levure, s'est montré identique à cette dernière (150). Par contre, on note la présence de trois molécules d'acide glutamique dans le *L. casei* factor de fermentation (2) et sept molécules de ce même amino-acide dans la vitamine Bc conjuguée (150). Les molécules d'acide glutamique sont vraisemblablement reliées entre elles par des liaisons peptidiques, aussi la vitamine-Bc-conjugase peut-elle être assimilée à une carboxypeptidase puisque son action laisse subsister une dernière molécule d'acide glutamique. De nombreuses recherches ont immédiatement montré que l'acide folique

de synthèse possède toutes les propriétés biologiques de la vitamine Bc tant en ce qui concerne son action sur la croissance des micro-organismes que dans l'hématopoïèse.

Chez l'homme, l'action de l'acide folique est remarquable dans toutes les anémies hyperchromes macrocytiques, mégalo-blastiques d'origine nutritive telles que la sprue (51), l'anémie mégalo-blastique gravidique et également l'anémie pernicieuse cryptogénétique (138). Cependant dans l'anémie d'ADDISON-BIERMER, son action est inférieure à celle des extraits hépatiques ; il en faut des doses très élevées (100 mg.) pour obtenir le même effet hématopoïétique que 1 à 8 mg. d'extraits de foie très actifs. Les altérations des muqueuses digestives ne disparaissent pas ou très rarement, de plus il ne prévient ni ne guérit les lésions médullaires et même pour certains auteurs les favoriserait (181, 182).

CASTLE (34) avait estimé que l'acide folique ne possédait pas de propriétés antipernicieuses.

On a pensé que l'efficacité de l'acide folique dans l'anémie pernicieuse pourrait être due à ce que les sujets atteints de cette maladie ne peuvent pas libérer l'acide folique à partir de la vitamine Bc conjuguée apportée par l'alimentation, ou à ce que la synthèse intestinale est défectueuse par suite de l'aplasie partielle de la muqueuse digestive (146). Elle agirait sans doute en tant que coenzyme dans la synthèse de la thymine, base pyrimidique constituante d'acides nucléiques qui sont indispensables à la formation du noyau et du cytoplasme basophile des cellules médullaires (198).

La structure et la provenance du facteur antipernicieux du foie ont déjà donné lieu à de très nombreuses recherches biochimiques. Mais ces travaux ont été gênés par le fait qu'il est impossible d'obtenir chez les animaux de laboratoire une anémie mégalo-blastique superposable à celle de l'homme ; une méthode de dosage microbiologique basée sur la croissance du *lactobacille lactis* Dorner (174), venue s'ajouter aux procédés cliniques et physiologiques, a permis à un groupe de chercheurs américains, RICKES, BRINK, KONINSKY, WOOD, FOLKERS, Laboratoires MERCK à Rahway, U.S.A., le 16 avril 1948, l'isolement à partir du foie, puis à partir d'*actinomyces griseus*, d'une substance cristallisable, la vitamine B₁₂ qui serait responsable de l'activité antipernicieuse des extraits hépatiques.

Mais presque simultanément et indépendamment, trois autres écoles ont isolé cette vitamine B_{12} : LESTER SMITH : laboratoire Glaxo à Greenford (Angleterre), le 24 avril 1948; WIJMEGA, LENS, MIDDELBECK (Hollande) (Laboratoire Organon à Oss) avec la collaboration de REICHSTEIN de Bâle, le 16 juin 1948 (224 ; ELLIS, PETROW-SNOOK, laboratoires British Drug Houses (Angleterre), le 24 novembre 1948 (64).

C'est, en effet, grâce à de multiples tests, tant physiologiques que microbiologiques et cliniques, et surtout grâce aux progrès récents accomplis dans le domaine des techniques et d'identification biochimique que l'on est parvenu à isoler du foie la vitamine B_{12} qui pourrait être le facteur antipernicieux même.

Isolée à partir du foie avec une rendement à la tonne de 25 mg. (SMITH), 28 mg. (WIJMEGA), on a abandonné pour l'extraction de la vitamine B_{12} cette matière première onéreuse. La vitamine B_{12} cristallisée commerciale d'origine américaine provient des milieux de culture d'*Actinomyces griseus*. La répartition très large dans la nature de cette vitamine : extraits de viande, déchets de poisson, cultures bactériennes, excréments d'animaux, permettra certainement de trouver d'autres matières premières intéressantes.

La préparation de cette vitamine repose essentiellement sur son absorption par le charbon activé, à partir d'un extrait aqueux et sur son élution par l'alcool à 60° ou par le phénol suivant la méthode de LALAND et KLEM (120). Le principe actif étant insoluble dans l'éther, on le fait passer de la phase phénolique en phase aqueuse par mélange avec de l'éther et agitation en présence d'eau. PETROW et SNOOK (149) ont, d'autre part, montré que la vitamine B_{12} est peu soluble dans les solutions aqueuses saturées de sulfate d'ammoniaque et assez solubles dans l'alcool butylique. La purification finale du produit se fait par adsorption sur amidon ou sur silice (177).

La vitamine B_{12} se présente sous forme de fines aiguilles rouges, dont les indices de réfraction sont : $n_{\alpha} = 1,652$, $n_{\beta} = 1,616$, $n_{\gamma} = 1,664$ (160). Si on l'expose assez longtemps à la lumière du jour, sa coloration se modifie, devient orange et s'accompagne d'un grand changement dans son absorption chromatographique. L'analyse du spectre d'absorption en solution aqueuse dans le visible et

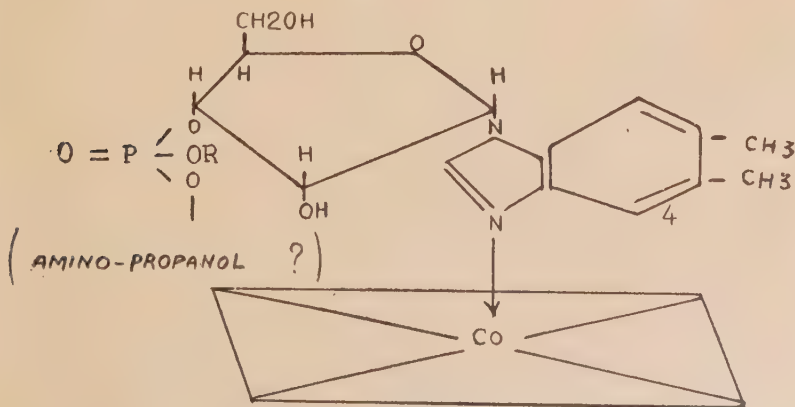
l'ultra-violet montre la présence de trois bandes à 2780, 3610 et 5480 unités angström. Les cristaux perdent leur couleur rouge et noircissent à 210-220° et ne fondent qu'à partir de 300° (160). Ils sont très solubles dans l'eau, les solutions salines, l'alcool absolu, l'acétone hydratée, l'acide acétique, et ne sont pas solubles dans les solvants organiques non polarisés tels que l'éther, le chloroforme (177, 178). Le pouvoir rotatoire de la vitamine B₁₂ est de

(α)_{23°}^{23°}_{656 3} = 59° ± 9°. L'autoclave pendant 15 minutes à 120° ne modifie pas son activité. Enfin, en solution acide ou alcaline, la vitamine B₁₂ est peu stable (24, 25).

Actuellement, on sait par l'étude du spectre aux rayons X que son poids moléculaire est situé entre 1550 et 1750 (45), par l'étude du spectre d'émission du résidu d'incinération qu'elle contient du cobalt (177) au taux de 3,5 p. 100. Elle contient en plus du carbone, de l'hydrogène, de l'oxygène, de l'azote et du phosphore dans les proportions que lui assigne la formule brute suivante :



On ignore encore la structure chimique de la vitamine B₁₂. L'étude des produits de décomposition en milieu liquide a permis d'isoler et d'identifier une série de fragments. Ce travail a fourni des renseignements complémentaires sur la structure de la vitamine B₁₂. Les travaux de FOLKERS et coll. (77), de BRINK et coll. (23, 24, 25), de HOLIDAY et coll. (95), de MILLS et de TOOD (27) montrent que sa constitution comporte le 5-6-diméthylbenzimidazol en combinaison avec le d-ribose phosphorylé sur le 2° et le 3° carbone. Dans la structure de la partie contenant le cobalt et qui représente les deux tiers de la molécule, on a caractérisé le groupement de l'amino-propanol (36, 41, 65, 238). On peut réunir les faits actuellement connus dans le schéma proposé par BEAVEN et coll.



Formule proposée pour la Vitamine B₁₂

Enfin, en 1950, divers chercheurs (24, 25, 110, 210) montrent la présence d'un groupement nitrile combiné au cobalt. Par l'étude des propriétés magnétiques de la molécule, DIEHL, VANDER HAAR et SEALOCK (58) pensent que le cobalt doit s'y trouver à l'état trivalent ou que, s'il est à l'état bivalent, il est couplé à un atome d'oxygène.

Pour le dosage de la vitamine B_{12} diverses méthodes ont été utilisées : physicochimiques (127, 209), chimiques (19), biologiques (14, 80, 157), cliniques (43) et principalement les méthodes de dosage microbiologique (31, 85, 174, 176, 227, 235).

Mais ces dernières méthodes ne sont acceptables que pour l'estimation de la vitamine B_{12} en solution pure ; elles deviennent discutables pour apprécier l'ensemble des facteurs favorables ou inhibiteurs dans les préparations complexes opothérapiques.

Quant à ses propriétés biologiques, l'action de la vitamine B_{12} dans l'hématopoïèse est caractérisée par un effet sur la maturation des érythroblastes. Grâce à des techniques histobiochimiques récentes (197), on sait que la formation intracellulaire de l'hémoglobine ne commence qu'au moment où disparaissent presque complètement les constituants nucléiques (5, 89) ; dans l'anémie pernicieuse, la cellule perd ses acides nucléiques beaucoup plus tard que normalement tout en s'imprégnant d'hémoglobine dans les délais normaux (197). Il s'agirait donc dans l'anémie de BIERMER d'une lésion biochimique, au niveau de la synthèse des nucléotides empêchant l'érythropoïèse normale (90, 101). RUZNIAK et UNGLEY pensent qu'il existe dans le sérum des biermériens des substances inhibitrices de la maturation médullaire agissant sur les cellules sanguines, nerveuses et des muqueuses (130, 136, 159, 209) et que l'une des fonctions de la vitamine B_{12} ainsi que de l'acide folique consisterait, peut-être, à neutraliser ces substances. Cependant cela n'expliquerait que grossièrement les troubles biochimiques observés dans l'hématopoïèse et qu'imparfaitement l'hypothèse émise par CASTLE sur la pathogénie de la maladie d'ADDISON-BIERMER (12, 13, 87, 88).

En fait, depuis les travaux de THORREL (197) et de WRIGHT et ses collaborateurs (242), on sait que la vitamine B_{12} et l'acide folique interviendraient l'un et l'autre chacun à un stade différent du métabolisme des nucléoprotéines.

La vitamine B₁₂ serait le coenzyme de réactions qui se produisent lors de la conversion de la thymine en thymidine tout comme l'acide folique interviendrait dans la synthèse de la thymine (173, 184). En effet, on sait que, pour le besoin de croissance de certaines bactéries lactiques, la thymidine peut être remplacée par la vitamine B₁₂, et il se peut que comme pour ces bactéries, le déficit biochimique causal de l'anémie d'ADDISON-BIERMER réside dans l'incapacité de synthétiser certains nucléotides et en particulier la thymidine à partir des pyrimidines et des pyrimidines (171, 172, 185, 237).

Cependant une autre hypothèse plus précise encore sur le mode d'action du facteur antipernicieux dans l'anémie de BIERMER peut être émise, grâce aux travaux récents de IRVING et collaborateurs (102). Pour ces auteurs, un extrait obtenu à partir de divers produits d'origine animale et appelé « animal protein factor » (A.P.F.) et sans doute la vitamine B₁₂ auraient un rôle important dans la synthèse de l'hème, et agiraient sans doute sur la méthylation au cours de cette synthèse. D'où l'importance de la mise en évidence des groupements méthyle fixés sur la molécule de vitamine B₁₂ (109) et le rôle de celle-ci en tant qu'agent de méthylation.

Les travaux sur les facteurs anti-anémiques du groupe des vitamines B ont donc été couronnés par un remarquable succès. Pendant longtemps la littérature a relaté des résultats dont le nombre considérable n'était pas le moindre élément de confusion. Nous assistons aujourd'hui à une simplification qui ramène essentiellement la plus grande partie pour ne pas dire la totalité des facteurs envisagés à une seule molécule chimique : la vitamine B₁₂.

Cependant il serait prématuré de conclure que le complexe des vitamines B₂ (194) a livré tous ses secrets avec la découverte de l'acide folique et de la vitamine B₁₂ : ce serait négliger la somme énorme des observations recueillies au cours de l'ensemble de ces recherches, observations dont certaines sont peut-être de nature à orienter vers de nouvelles et intéressantes acquisitions.

IV. — PRINCIPE ANTIPERNICIEUX DU FOIE

Alors que la recherche des facteurs anti-anémiques dans le groupe des vitamines B₂ (194) conduisait au succès que l'on sait, les travaux sur l'isolement de l'hormone hématopoïétique supposée présente dans le foie se poursuivaient avec acharnement. La mise en évidence de l'activité du foie total dans le traitement de l'anémie pernicieuse date des travaux de MINOT et MURPHY (131). La découverte de la vitamine B₁₂ dans le foie doit-elle faire considérer cette substance comme le principe antipernicieux hépatique ? Certainement pas, comme va le montrer la relation des travaux qui s'y rapportent et qui, dans l'ensemble, aboutissent à la préparation d'extraits déjà hautement purifiés, très actifs dans l'anémie de BIERMER et cependant dépourvus de toute trace de vitamine B₁₂. Cette constatation et ce que nous savons de la physiologie de l'anémie pernicieuse justifient la recherche d'une hormone hématopoïétique dans le foie.

COHN, MINOT et leurs élèves abordent les premiers le problème du fractionnement des extraits hépatiques (38). Les premières opérations de leur technique consistent à extraire le foie à l'eau (*), puis à éliminer les protéines par coagulation à la chaleur (70° C). L'extrait est concentré au bain-marie puis délipidé à l'éther. On précipite par l'alcool de façon à obtenir un titre final d'au moins 95°. Le précipité est redissous dans l'eau et cette solution est soumise à la dialyse. Le dialysat évaporé à sec constitue la fraction G. Elle est active chez le biermérien à la dose de 9 à 14 g. par jour et par voie buccale. Cette dose correspond environ à 200-400 g. d'organe frais. Par voie parentérale l'activité est environ 25 fois plus grande, mais l'injection n'est pas toujours parfaitement tolérée. La purification est poursuivie en agitant la solution aqueuse de la fraction G avec un gel de silice à pH = 5 ; le filtrat obtenu est extrait à l'alcool butylique. On obtient ainsi la fraction L qui est traitée par l'acétate de plomb ; le précipité obtenu est

(*) Cette opération ressemble à la préparation de l'extrait de foie utilisée par les empiriques javanais contre l'anémie de la sprue.

rejeté comme ne contenant aucune substance active. Le filtrat est traité par l'acide phosphotungstique. Le précipité de phosphotungstate est lavé à l'acétone, on élimine l'ion phosphotungstique et on récupère les produits actifs par précipitation dans l'alcool fort (titre final 95° au moins). On obtient ainsi l'extrait injectable par voie intraveineuse ou fraction I.E. Les purifications se terminent par une série de dissolution dans l'eau et de reprécipitation au moyen de mélanges éthéro-alcooliques de compositions diverses. Ces opérations conduisent finalement à un produit actif à la dose journalière de 140 mg. chez le biermérien.

Les propriétés de ces extraits très purifiés (fraction Z) peuvent se résumer ainsi : le produit obtenu est soluble dans l'eau, le phénol, le glycérol, la formiamide, l'acide acétique ; sa solubilité dans l'alcool fort (95°) est reconnue très faible, cependant le principe actif s'avère plus soluble dans l'alcool de ce titre après qu'il ait été régénéré de son phosphotungstate. On peut penser que ce changement de solubilité peut être dû à une modification de la structure chimique (ouverture d'un cycle lactonique par exemple) ou au fait qu'il s'agit tantôt d'un dérivé salin, tantôt du même corps sous sa forme acide ou pseudo acide libre. Enfin, il est encore possible que la présence d'impuretés favorise son adsorption sur les précipités qui se forment en milieu alcoolique. La fraction Z ne donne aucune des réactions caractéristiques des protéines, des glucides, des lipides, du tryptophane, de la tyrosine, de l'arginine, de la cystine, de la créatinine, du fer, du soufre ou du phosphore. Elle ne précipite pas avec les acides trichloracétique, flavianique. Par contre, on obtient des précipités avec l'acide phosphotungstique, le sulfate acide de mercure, le chlorure d'or ou de platine et le nitrate d'argent.

La fraction Z comprend environ 10 p. 100 d'azote. Les auteurs ne pensent pas qu'il s'agisse d'acides aminés ou d'un polypeptide, l'étude de la solubilité, de l'électrophorèse, la formation d'un précipité par le calcium ou le baryum en milieu hydro-alcoolique suggèrent la présence d'un groupement carboxylique dans la molécule (39). L'existence d'un groupement amine tertiaire paraît probable. Mais il faut exclure la présence des noyaux puriques et pyrimidiques, ne serait-ce qu'en raison du taux relativement bas d'azote. La réaction au copeau de sapin imprégné d'acide chlorhydrique étant négative, on ne saurait admettre l'existence du noyau pyrrolique. L'analyse

du produit ne permet de déceler aucune des vitamines ou des facteurs connus à cette époque.

WEST et ses élèves (215) n'apportent pas de progrès appréciable en reprenant la méthode de COHN. Ils déclarent avoir préparé un sel de quinine répondant à la formule $C_{20}H_{24}N_2O_8$, $C_{10}H_{12}N_2O_6$. Dans l'hydrolysât de leur produit actif, ils caractérisent l'acide β -hydroxyglutamique et la β -hydroxyproline. Ils concluent à la nature peptidique ou dicétopipérazique de leur produit. Ces auteurs ne paraissent pas avoir poussé la purification aussi loin que l'équipe de COHN.

DAKIN, WEST et ses collaborateurs (50) mettent en œuvre de nouvelles techniques de purification de la fraction G de COHN. Les innovations essentielles consistent en des essais de précipitation du principe actif par le sel de REINECKE et le fractionnement par relargage au moyen de sels neutres (chlorure de sodium, sulfate de magnésium, sulfate d'ammonium). Le produit qu'ils isolent contient aux environs de 15 p. 100 d'azote ; l'azote aminé est pratiquement négligeable, mais il augmente jusqu'à 10 p. 100 après hydrolyse. Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$ est trouvé égal à -120° . Ces auteurs pensent être en présence d'un polypeptide d'un poids moléculaire compris entre 2.000 et 5.000 qui serait assez proche des albumoses (49). La pepsine agit en provoquant une augmentation sensible de l'azote aminé sans détruire l'activité hémopoïétique ; par contre, le suc pancréatique est sans action. Après hydrolyse, les acides aminés suivants ont été caractérisés : arginine, glycine, leucine, acide aspartique, hydroxyproline et peut-être la proline et l'acide hydroxyglutamique. La glucosamine et la lysine, trouvées dans les premières préparations, disparaissent après purification.

Ces observations nous éloignent considérablement des conclusions de COHN ; ce dernier déclare en effet avoir obtenu des extraits exempts de polypeptides, d'acides aminés et croit que le principe actif est une substance simple, de faible poids moléculaire. Le produit de DAKIN apparaît, au contraire, comme un mélange beaucoup plus complexe. D'ailleurs WEST et MOORE (216) en séparent deux groupes de constituants, en proportions sensiblement égales, par électrophorèse : un, de lente mobilité et un autre de mobilité plus rapide, chargé positivement pour $pH = 4$ et dont la charge s'inverse dès $pH = 7$. Le premier

constituant est dénué d'action hématopoïétique, le second se montre actif à la dose de 40 mg. chez le biermérien.

LALAND et KLEM (120) obtiennent des extraits très actifs par une méthode de fractionnement dont voici les principales étapes : les protéines hépatiques sont éliminées par un premier traitement à l'acétone à 50 p. 100, puis par coagulation à chaud, et enfin adsorption sur des gels d'hydrates métalliques. On obtient ainsi, après évaporation, 3 à 4 g. de matières sèches pour 100 g. de foie frais. On procède ensuite à de très nombreuses adsorptions par le charbon, suivies d'élutions par le phénol. Les éluats phénoliques sont agités avec l'eau et l'éther ; le principe actif passe dans la couche aqueuse. Par la suite, on effectue de nombreux traitements par l'alcool méthylique, l'alcool, l'éther... Entre chaque étape, l'activité biologique des fractions isolées est essayée : la fraction dite heptomin 11 est active à la dose quotidienne de 53 mg. correspondant à 200 g. de foie (STRANDELL [192]) ; la fraction B à 10 mg. ; les fractions BB a1 et BB a 3b se révèlent actives à la dose de 1 mg., correspondant à 500 g. de foie ; 0,7 mg. (provenant de 800 g. de foie) de la fraction BB a B l'u. s. E, donnent une bonne réponse de l'hématopoïèse (191). Ces résultats témoignent des progrès considérables réalisés dans la purification du principe antipernicieux au cours des opérations.

Le procédé de l'adsorption sur charbon suivie de l'éluion par le phénol est appliqué par UNGLEY (207) sur le produit obtenu par la méthode de DAKIN. Cet auteur obtient ainsi une fraction 217 A qui se montre 2,5 fois plus active que le matériel de départ. Cela confirme que les extraits préparés selon DAKIN sont loin d'être très purs et que le procédé de LALAND est efficace pour la purification du principe antipernicieux du foie. WILKINSON obtient des résultats en plein accord avec cette dernière conclusion (115, 225, 226).

KARRER introduit dans la méthode de LALAND et KLEM une précipitation par l'acide sulfosalicylique qui lui permet d'éliminer certains produits inactifs.

L'extrait obtenu contient 14,63 p. 100 d'azote ; il est actif à la dose journalière de 2 mg. (112, 113, 151). Il ne contient ni flavines, ni purines, ni ptérines, ni phosphore, ni pentose. L'hydrolyse fait passer le taux d'azote aminé de 0,8 à 9 p. 100 et libère de l'arginine et de la tyrosine mais aucun

des acides aminés suivants : phénylalanine, oxyproline, glycine, tryptophane, histidine.

Bien d'autres techniques ont été mises en œuvre pour l'isolement du principe antipernicieux, mais ne paraissent pas aussi sûres et aussi bien étudiées que les précédentes. En voici une rapide relation. FÉLIX et FRÜHWEIN (73) se débarrassent des protéines par précipitations au tanin, puis ils préconisent la précipitation du principe actif par le sulfate mercurique en présence d'alcool et d'éther. Le produit obtenu contient du soufre mais pas de phosphore. Il ne présente pas de constituant indolique (réaction glyoxylique négative). La diazo-réaction est positive ainsi que celles de SAKAGUCHI et de la ninhydrine. L'hydrolyse acide n'augmente pas le taux de l'azote aminé. Le produit contient 11,85 p. 100 d'azote dont 30 p. 100 sont de l'azote aminé. Néanmoins ce produit n'a pas été essayé sur le biermérien.

ERDOES (68) essaie la précipitation par le nitrate d'argent sur des extraits de foie déprotéinisés par l'alcool à 70°. Il étudie le dérivé argentique obtenu pour lequel il donne une teneur en azote de 14,41 et un poids moléculaire voisin de 6.000. Il ne relate aucun essai clinique et se contente d'essais dans l'anémie à la phénylhydrazine chez le Lapin.

JACOB discute longuement la nature des extraits de foie actifs, mais, en dehors de l'intérêt de son travail au point de vue documentation, les résultats expérimentaux n'apportent pas de progrès dignes de remarque (104).

L'hypothèse de ALEKSANDROWICZ et GABRYELSKI (1) d'après laquelle l'héparine serait l'un des facteurs hématopoïétiques importants du foie ne paraît pas devoir être retenue.

JONES et ses élèves (108) reconnaissent une activité anti-anémique à des extraits de noyaux cellulaires (globules de Poulet ; rate, foie, rein, cœur, muscle, thymus et pancréas de Bœuf, foie de Saumon). Ils concluent que le stimulant de l'hématopoïèse fait partie intégrante des noyaux cellulaires. La démonstration de ce fait reste à établir.

Le glutathion sous forme oxydée sera considéré, à la suite des travaux de BUCHANAN (26) comme un constituant du principe antipernicieux par FLEMING (76), mais KOSER (118) démontre que ce polypeptide est en réalité sans importance.

SUBBAROW et JACOBSON s'attachent à démontrer que l'activité du foie n'est pas due à une substance unique mais qu'elle résulte du concours de plusieurs facteurs. A la suite de fractionnements très laborieux (75, 106, 186, 187) portant sur plusieurs tonnes de foie, ces auteurs concluent que les extraits hépatiques contiennent : un facteur primordial et trois facteurs accessoires désignés par les lettres A, C et F. Ces derniers sont inactifs dans l'anémie pernicieuse. Le facteur primordial, seul actif dans l'anémie de BIERMER, est extrait par des techniques qui résultent d'une combinaison des procédés de DAKIN (mise en œuvre du sel de Reinecke) et de LALAND et KLEM (adsorption par le charbon et élution phénolique). Ce facteur primordial possède toujours une activité antipernicieuse, mais celle-ci est plus intense lorsqu'elle est considérée avec celles des trois facteurs accessoires A, C et F.

Le facteur A, obtenu à la suite d'une précipitation par l'acétate mercurique, n'est pas autre chose que la 1-tyrosine pure. Quoique obtenu cristallisé, le facteur C est un mélange où l'analyse permet d'identifier avec certitude 80 à 85 p. 100 de xanthine et 5 p. 100 de xanthoptérine. La fraction F est probablement un polypeptide.

En fait, l'important travail de SUBBAROW et JACOBSON n'aboutit pas à démontrer l'existence de plusieurs facteurs antipernicieux dans le foie mais simplement à ceci : une fraction déterminée possède seule le pouvoir antipernicieux et ce dernier est considérablement renforcé par la présence dans les extraits de certaines substances adjuvantes dénuées, par ailleurs, de toute activité spécifique antipernicieuse. A cet égard, les résultats de ces auteurs sont très nets et en particulier ceux concernant la tyrosine. Cet acide aminé, injecté à la dose de quelques mg. par jour, simultanément au facteur primordial, permet toujours d'obtenir des crises réticulocytaires plus importantes et une augmentation du nombre des hématies plus rapide que lorsqu'on injecte le facteur primordial tout seul. Cet effet ne s'observe jamais lorsque la tyrosine est donnée par voie buccale même à des doses beaucoup plus fortes.

Cette action adjuvante des facteurs accessoires est à rapprocher de celle de l'histidine et du tryptophane. Ces deux acides aminés, ainsi qu'il résulte des travaux modernes (47, 61, 148, 199), ne possèdent aucune action spécifique dans l'anémie de BIERMER, contrairement à ce qu'avaient

annoncé FONTES et THIVOLLE (78). L'importance de leur rôle comme médicaments adjuvants n'en mérite pas moins d'être retenue et ce, d'autant plus que SUBBAROW et JACOBSON ont montré que leur facteur accessoire F contient une molécule indolique qui est vraisemblablement du tryptophane. Plus tard, ces auteurs ajoutent la guanosine et l'histidine à la liste des facteurs utiles pour renforcer l'action du facteur primordial (105).

La notion de pluralité des facteurs antipernicieux du foie conduit EISLER, HAMMARSTEN et THEORELL (63) à reprendre l'étude de la cataphorèse des extraits de foie. Ils mettent en évidence deux fractions : une première (R) qui migre au pôle positif pour un pH compris entre 4,5 et 6,6 et une deuxième (E) qui va au pôle négatif. Ces résultats sont en accord avec ceux déjà signalés de WEST et MOORE (216). La fraction E est capable de provoquer une crise réticulo-cytaire mais ne permet pas de noter une augmentation des réticulocytes. La fraction E seule est sans action aussi bien sur la réticulocytose que sur l'érythropoïèse. Mais ces deux fractions, E et R injectées simultanément, déterminent la crise réticulocytaire et l'augmentation du nombre des hématies. Il est à noter que la partie E peut être remplacée par d'autres substances, par exemple par l'acide thymonucléique. C'est là un exemple du peu de spécificité de la crise réticulocytaire comme test de l'activité antipernicieuse. WICHELS et HOFER (217) aboutissent à des conclusions analogues ainsi que MAZZA et PENATI (129). Pour ces derniers le facteur adjuvant est un complexe contenant un nucléotide à adénine et un polypeptide formé de : proline, oxyproline, histidine, arginine, acide hydroxyglutamique... Leur travail manque d'essais cliniques.

Tel est l'aperçu de l'ensemble des méthodes suivies pour obtenir des extraits de foie de plus en plus concentrés en principe antipernicieux. Des progrès très considérables ont été acquis dans cette voie : beaucoup d'extraits se révèlent actifs à la dose journalière de 1 mg. de produit sec qui correspond, selon le procédé mis en œuvre, à quelques dizaines ou à quelques centaines de grammes d'organe frais. Les procédés les plus sûrs, c'est-à-dire ceux au sujet desquels les essais cliniques se sont montrés les plus nettement positifs, sont essentiellement les suivants :

a) la méthode de fractionnement de COHN (la fraction G sert presque toujours de point de départ aux autres techniques) ;

b) la méthode de LALAND et KLEM (adsorption par le charbon et élution phénolique) qui donne les produits les plus actifs ;

c) le procédé de DAKIN, mettant en œuvre la précipitation par le sel de REINECKE et le relargage par les sels neutres, est très laborieux et conduit à des extraits moins purs que les deux premières méthodes.

Dans l'ensemble, le principe antipernicieux apparaît comme une molécule de faible poids moléculaire, azotée, active dans l'anémie de BIERMER à des doses très faibles souvent inférieures au milligramme. La substance n'est pas colorée, elle est soluble dans l'eau, l'alcool butylique, la pyridine, et paraît infiniment moins soluble dans l'alcool fort, pratiquement insoluble dans le chloroforme et la plupart des autres solvants organiques. Les extraits purifiés de foie ne possèdent pas de spectre ultra-violet caractéristique ainsi que l'ont montré EMERY et PARKER (67). Les auteurs s'accordent sur la grande thermostabilité du principe antipernicieux. DAKIN signale qu'il est alcalino-labile.

La comparaison des extraits hépatiques les plus purifiés avec l'acide folique montre qu'il ne saurait s'agir de ce corps puisque celui-ci est fortement coloré en jaune et présente un spectre ultra-violet très caractéristique.

L'acide folique est également thermostable mais il est détruit par les acides et résiste mieux aux alcalis alors que le principe antipernicieux paraît être acidostable et alcalino-labile. L'acide folique possède de nettes propriétés antipernicieuses mais à des doses de l'ordre de 100 mg. qui sont donc beaucoup plus élevées que celles de l'ordre du milligramme auxquelles se manifeste l'activité des extraits hépatiques les plus purs.

De même la vitamine B₁₂ possède un spectre d'absorption que nous ne retrouvons pas dans certains extraits hautement purifiés et actifs tant sur le biermérien que sur l'animal soumis à l'inanition protéique.

V. — FACTEUR GASTRIQUE ET GASTROTHERAPIE

L'hypothèse de CASTLE d'après laquelle une substance antipernicieuse prendrait naissance sous l'action d'un « facteur intrinsèque » présent dans le suc gastrique des

sujets normaux, sur diverses protéines alimentaires apportant un « facteur extrinsèque » a donné lieu à quelques recherches sur la nature de l'un et l'autre de ces facteurs.

Le facteur intrinsèque est sécrété par les glandes de Brunner diversement localisées selon l'espèce animale : région du fundus chez l'Homme, région pylorique chez le Porc, caillette chez les Bovidés. Le duodénum est également producteur de facteur intrinsèque. L'extraction de ce facteur a été tentée par KLEIN et WILKINSON (115) selon la méthode schématisée ci-dessous. Le suc d'expression de la muqueuse gastrique est précipité par l'alcool. Le précipité est redissous dans de l'acide chlorhydrique 0,1 N. On ramène à $\text{pH} = 4,2$ et on élimine le précipité qui s'est formé. Le filtrat est additionné d'alcool et porté à $\text{pH} = 6,2$. Le précipité qui apparaît alors contient des traces de pepsine et le facteur intrinsèque ou hémopoïétine des auteurs. Ces extraits ont connu une certaine vogue dans le traitement par voie orale des anémies. Au point de vue chimique, ils donnent les réactions des protéines et contiennent des traces de fer et de cuivre. Leur activité est détruite par la pepsine et la trypsine. Enfin elle est thermostable, ce qui suffit à la distinguer de l'hormone hépatique thermostable. Ces propriétés amènent à rapprocher le facteur intrinsèque d'un enzyme dont la sécrétion serait complètement ou partiellement tarie chez les biernériens. A l'appui de cette façon de voir, TAYLOR et ses collaborateurs (82, 193) ont montré que le suc gastrique contient normalement un enzyme protéolytique capable d'attaquer la caséine en milieu alcalin, se distinguant de la pepsine car il est inactif au-dessous de $\text{pH} = 4$ et de la trypsine car il ne libère que des traces d'azote aminé, même au bout de 24 heures d'action. LASCH (123) établit que le suc gastrique des biernériens est exempt d'un enzyme de cette nature. Cependant, il est bien évident que des données aussi réduites ne permettent pas l'identification du facteur intrinsèque dont la nature, même enzymatique, demeure à démontrer.

Le mécanisme de la réaction entre les facteurs intrinsèque et extrinsèque, d'où résulte la formation d'un principe antipernicieux, demeure encore très obscur. On sait seulement que la réaction n'a lieu qu'entre les $\text{pH} 5$ et 7 . Peut-être s'agit-il d'une réaction enzymatique ? Un chauffage du milieu réactionnel à 70 ou 80°C . conduit à

un produit totalement inactif même s'il a été précédé d'une incubation plus ou moins prolongée. Il faut en déduire que le facteur antipernicieux en question est lui-même thermolabile, ce qui le distingue du facteur hépatique. Cependant KLEIN et WILKINSON (115), appliquant le procédé de COHN, ont tenté d'extraire le principe antipernicieux formé après incubation de viande de Bœuf en présence de leur hémopoïétine et ils déclarent avoir obtenu des extraits très actifs chez le biermérien. Ces extraits présentent une thermostabilité toute relative puisqu'ils commencent à perdre leur activité au delà d'une demi-heure de chauffage à 60° C. Par contre, ROSSI faisant agir l'hémopoïétine sur des autolysats de levure, parvient à obtenir des extraits thermostables et actifs chez le biermérien par voie sous-cutanée. Cet auteur pense pouvoir assimiler le produit qu'il a isolé au facteur hépatique, mais la comparaison est rendue difficile par la présence d'impuretés ; le produit donne en effet la réaction du biuret, à la ninhydrine, du tryptophane et de l'histidine, il contient de l'azote, du soufre et du phosphore (163).

En résumé, l'hypothèse de CASTLE n'a pas reçu de confirmation solide. La gastrothérapie a, de ce fait, perdu beaucoup de terrain sur l'hépatothérapie et l'emploi du complexe des vitamines B dans la lutte contre les anémies. Néanmoins le fait mis en évidence par cet auteur conserve une très grande valeur au point de vue physiopathologique. Il montre que l'intervention de l'estomac est indispensable à la formation du principe antipernicieux dans l'organisme, ce qui est, par ailleurs, en accord avec les troubles du chimisme gastrique qui caractérisent l'anémie d'ADDISON-BIERMER.

Il paraît évident que l'estomac n'élabore pas un principe antipernicieux identique à celui du foie car, dans le cas contraire, on aurait facilement réussi à préparer un extrait, de propriétés identiques à celles de ce dernier, après action du suc gastrique sur les protéines alimentaires. Nous avons vu, en effet, que les tentatives faites dans ce but ne sont pas pleinement satisfaisantes. On peut cependant envisager comme probable qu'une substance intermédiaire de la biosynthèse du principe antipernicieux par le foie, prend naissance au niveau de l'estomac.

Les travaux modernes apportent des données nouvelles et quelque peu différentes de ces dernières conceptions

admises jusqu'à ce jour. Actuellement, certains auteurs (13, 35, 239) admettent que l'anémie pernicieuse résulterait d'un trouble de l'absorption de la vitamine B_{12} considérée comme le principe extrinsèque. Ce trouble résulterait de l'absence dans le suc gastrique du facteur intrinsèque. GLASS aux U.S.A. (83), LATNER et UNGLEY (125) en Grande-Bretagne ont isolé une mucoprotéine gastrique d'une activité analogue à celle du principe intrinsèque. Cette substance est sécrétée par les cellules mucoïdes du collet des glandes gastriques du fundus et du corps ; elle est distincte du mucus né de l'épithélium de surface. Dans le suc gastrique cette substance est présente en quantité variable, 2 grammes pour 6 litres en moyenne. Par l'analyse électrophorétique on retrouve la mucoprotéine vers l'anode sous forme d'un clocher homogène ; cette fraction à l'analyse se révèle être soit une mucoprotéine soit un mucopolysaccharide. S'agit-il du facteur intrinsèque lui-même, ou simplement d'un véhicule de celui-ci ? Il n'a pas encore été possible de le préciser. Le suc gastrique des sujets normaux renfermant du facteur intrinsèque favorise incontestablement l'absorption de la vitamine B_{12} quand elle est administrée par voie orale.

Quel est le mécanisme de cette absorption ? Cela reste à découvrir. WELCH et HEINLE (126) ont émis l'hypothèse d'une combinaison de la vitamine B_{12} avec le facteur intrinsèque, qui pourrait faciliter le passage de cette vitamine à travers l'épithélium intestinal.

D'après TERNBERG et BEAKIN (195) par contre, certaines bactéries dont la nutrition réclame de la vitamine B_{12} cessent de pousser si des extraits gastriques sont ajoutés au milieu : la vitamine B_{12} serait inactivée par les protéines auxquelles elle est liée dans ces extraits et serait ainsi inutilisable par les bactéries. On a supposé que chez l'homme normal la combinaison de la vitamine B_{12} à certains composants du suc gastrique est susceptible de prévenir l'utilisation ou la destruction de cette vitamine par les bactéries au niveau de l'intestin grêle.

Mais on a démontré que la flore intestinale ne contient qu'une infime minorité de bactéries réclamant de la vitamine B_{12} pour leur développement. Par ailleurs, des protéines, autres que celles provenant des extraits gastriques, ont aussi la propriété de rendre la vitamine B_{12} inutilisable par les bactéries.

D'autres travaux ont montré que certaines bactéries, en particulier les souches de *B. coli*, absorbent de fortes quantités de vitamine B_{12} , quoique leur culture n'en ait pas besoin. En outre, on a prouvé que les grandes soustractions de vitamine B_{12} par le *B. coli* pourraient être prévenues en donnant de petites quantités d'extraits gastriques, ce qui ne se produit pas avec d'autres protéines ou extraits d'organe. On a donné le nom de « facteur coli » au facteur gastrique, apte à se combiner in vitro à la vitamine B_{12} et à dissimuler le rôle de facteur de croissance de celle-ci à l'égard du *B. coli* (SHIVE). Les résultats obtenus ont amené à penser que le « facteur *Coli* » et le principe intrinsèque seraient identiques (93) ou tout au moins qu'ils présenteraient des propriétés analogues.

VI. — CONCLUSIONS

A la pluralité des causes de l'anémie la thérapeutique s'efforce, dans chaque cas, d'opposer une médication spécifique. Le fer est le médicament des anémies hypochromes microcytiques du type chlorose. Une hygiène alimentaire bien comprise vient facilement à bout des anémies consécutives à des carences diverses dont les plus importantes à retenir sont celles en vitamines du groupe B (*). Chaque fois que la cause d'une anémie secondaire est connue, le pronostic dépend de l'efficacité du traitement de cette cause ; soigner les troubles gastro-intestinaux, les infections ou les intoxications et lutter contre une anémie qui n'est alors qu'un syndrome moello-sanguin. Par exemple, l'anémie du cancéreux suivra l'évolution fatale de cette affection.

L'anémie d'ADDISON-BIERMER résiste à tous les traitements précédents et exige la mise en œuvre d'un médicament qui, dans l'absolu, est l'hormone hématopoïétique du foie. Celle-ci n'a pas encore été identifiée mais sa purification est extrêmement avancée. Elle agit au niveau de la

(*) La richesse de la levure de bière en l'ensemble des vitamines du groupe B en fait un médicament de choix de la plupart des anémies secondaires y compris celle de la grossesse. Sa richesse en acide folique surtout conjugué explique qu'elle réussisse parfois dans l'anémie pernicieuse à condition de prescrire des doses élevées. Ses inconvénients résident dans ses caractères organoleptiques peu engageants et sa mauvaise digestibilité.

moelle sur la transformation des proérythroblastes en érythroblastes. Si l'on admet que son action se limite strictement à cette phase, on conçoit que le facteur antipernicieux ne soit pas suffisant à lui seul pour assurer l'ensemble du cycle de l'hématopoïèse qui exige vraisemblablement l'appoint d'autres facteurs. Ces derniers sont constitués par un ensemble de médicaments adjuvants dont la mise en évidence ressort essentiellement des travaux de SUBBAROW et aussi de nombreuses observations des cliniciens qui ont souvent constaté « qu'une préparation de foie hautement purifiée se révélait moins active que d'autres plus impures ». Dans ce dernier cas, il ne convient pas toujours de conclure que le principe antipernicieux a été perdu ou détruit au cours des purifications. Le plus souvent, en effet, l'activité antipernicieuse subsiste mais elle est moins manifeste en raison de la disparition des facteurs accessoires. Parmi ces derniers, il faut citer les acides aminés tels que la tyrosine, l'histidine, le tryptophane, l'arginine, l'acide glutamique... si souvent caractérisés, soit libres, soit à l'état de peptides dans les extraits hépatiques imparfaitement purifiés. Les bases puriques, les acides nucléiques, les ptérines, les vitamines du groupe B doivent être comptés parmi les facteurs accessoires.

Une place à part doit être réservée à l'acide folique et à ses dérivés. Cette substance n'est pas seulement anti-anémique mais possède également une action antipernicieuse à la condition de l'utiliser à la dose relativement élevée de 100 mg. par jour. L'acide folique, néanmoins, ne doit pas être identifié au principe hépatique.

Quant à la vitamine B₁₂, avec le recul que nous possédons actuellement, on doit reconnaître que son emploi isolé ne donne pas toute satisfaction. La question fut longuement discutée au « Congrès International d'Hématologie » de Cambridge (40) où plusieurs auteurs, se fondant sur des considérations hématologiques et cliniques, furent d'accord pour conclure que la glande hépatique renfermait d'autres facteurs que la vitamine B₁₂ nécessaires au développement d'une activité antipernicieuse totale.

L'absence d'un test à la fois commode et spécifique suffit à expliquer le retard des recherches relatives au principe antipernicieux du foie.

Quant à l'abandon progressif de la gastrothérapie, il paraît devoir s'expliquer par le fait que la substance qui

prend naissance au niveau de l'estomac était considérée jusqu'à ce jour comme un simple intermédiaire de la synthèse hépatique du principe antipernicieux proprement dit. Mais les récents progrès accomplis tant dans l'identification du facteur intrinsèque que dans l'étude du mécanisme d'action du facteur gastrique nous permettent d'assister aujourd'hui à un renouveau de la gastrothérapie.

VII. — OBJET DU TRAVAIL

Nous venons de voir dans l'introduction que la recherche d'un test biologique du facteur hépatique antipernicieux demeure à l'ordre du jour.

Nous nous sommes proposés dans ce travail de rechercher une méthode expérimentale capable d'instaurer chez l'animal une anémie suffisamment stable pour étudier le phénomène, sensible au facteur hépatique antipernicieux et aussi spécifique que possible de ce facteur, enfin pratique, pouvant être réalisée assez rapidement sur un petit animal de laboratoire et permettant ainsi des séries d'expériences assez nombreuses.

Des diverses méthodes aptes à provoquer un état d'anémie chez l'animal nous avons pensé qu'il y aurait intérêt à étudier l'anémie devant résulter de l'inanition azotée. En effet, il était permis de supposer que les modifications physiologiques de l'hématopoïèse se produiraient sans destruction des éléments sanguins ni action toxique sur la moelle. Le procédé a donc l'avantage de se trouver à l'abri de certaines critiques, en particulier celles qui pèsent sur les anémies par inoxtication.

L'animal que nous avons choisi pour notre travail est le rat blanc, qui, avec ses huit à neuf millions d'hématies par millimètre cube, permet d'obtenir des chutes globulaires importantes ; sa faible taille et son prix permettent de l'employer pour des expériences en série. Notre étude a porté sur trois cents rats environ.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons cherché à appliquer le test biologique des réactions hémato-logiques observées chez le rat anémié par inanition protéique au contrôle des étapes que comporte la préparation des extraits de foie injectables par les méthodes les plus couramment utilisées.

RECHERCHES PERSONNELLES

PREMIERE PARTIE

RECHERCHE D'UN TEST BIOLOGIQUE DU FACTEUR HÉPATIQUE ANTIPERNICIEUX

Nous avons étudié les caractères de l'anémie qui apparaît chez le rat blanc maintenu pendant une période suffisamment longue à un régime strictement dépourvu de protides.

Nous avons utilisé pour notre travail des rats adultes, d'un poids compris entre 150 et 200 grammes ; les animaux ont été soumis aux examens suivants : on a suivi les variations de leur poids, du nombre de leurs hématies, de la concentration en hémoglobine de leur sang ; on a pu ainsi suivre les variations de leur valeur globulaire ; enfin, on a déterminé le taux de leurs réticulocytes.

Avant de donner les résultats de nos expériences, voici quelques indications sur les techniques utilisées.

I. — TECHNIQUES MISES EN ŒUVRE

1° Régime.

Les animaux sont placés dans des cages individuelles. Ils reçoivent ad libitum de l'eau et un régime composé de la façon suivante :

Saccharose	150 g.
Amidon de blé	150 g.
Beurre lavé	100 g.
Mélange salin d'Osborne	25 g. (*)
Sciure lavée	25 g.
Vitamines.	

Afin d'enlever au beurre la plus grande partie de l'azote qu'il contient, on l'a lavé 7 fois en le faisant fondre à 40° C. en présence de 6 à 8 fois son poids d'eau, un séjour ultérieur à la glacière permettant une séparation facile de l'eau de lavage.

La sciure a été introduite dans notre régime comme aliment encombrant ; elle provient du bois de hêtre. Elle a été passée au tamis fin, puis mise à macérer pendant 48 heures dans de la soude à 10 p. 100, et lavée pendant 4 jours à l'eau courante. La même opération est renouvelée en substituant l'acide chlorhydrique à 10 p. 100 à la lessive alcaline. On termine par d'abondants lavages à l'eau.

Les vitamines ont été données aux doses capables de couvrir les besoins des animaux dans les conditions de l'expérience, les vitamines A et D sous forme d'huile de foie de morue, les vitamines B₁, B₂, PP à l'état de corps

(*) Mélange salin d'Osborne complété avec du manganèse. ClNa : 100 ; (PO₄)₂ Ca₃ : 110 ; Citrate de Mg : 65 ; KCL : 15 ; Citrate fer : 10 ; SO₄Mn : 1 ; I : 0.05 ; IK : 0.10.

purs. Les vitamines ont été données aux doses quotidiennes suivantes par animal :

Huile de foie de morue : 11 gouttes

(soit vitamine A = 10 U.I.

vitamine D = 2 U.I.)

Vitamine B₁ = 7,5 µg.

Vitamine B₂ = 25,0 µg.

Vitamine PP = 6,0 µg.

Un tel régime apporte en abondance des glucides, des lipides et des sels ; il contient de 0,4 à 0,6 mg. d'azote par gramme suivant les préparations. Les animaux en consomment par jour de 10 à 20 g., n'apportant qu'une quantité infime d'azote.

2° Prise de sang.

Le sang nécessaire aux déterminations hématologiques est prélevé après section nette de l'extrémité de la queue de l'animal. Une ligature est posée immédiatement après pour éviter l'hémorragie possible. Lorsqu'il fait trop froid, il arrive que l'animal ne saigne pas ; il suffit alors de le maintenir quelques minutes dans une étuve à 50° C. pour pouvoir effectuer les prélèvements sans difficulté.

3° Numération globulaire.

Les numérations globulaires sont effectuées par les méthodes classiques ; nous avons utilisé la cellule de Malassez à remplissage par capillarité. Afin d'éliminer au maximum les causes d'erreur, nous avons toujours utilisé pour un même animal la même pipette mélangeur de Potain et la même cellule à numération.

4° Dosage de l'hémoglobine.

Nous avons utilisé, après l'avoir mise au point (211), une microméthode colorimétrique simple et rapide de dosage de l'hémoglobine, après sa transformation en un dérivé stable, la méthémoglobine. L'agent oxydant utilisé dans ce but, le ferricyanure de potassium, donne quantitativement naissance à de la méthémoglobine à partir de l'hémoglobine.

La pratique de dosage est la suivante : à l'aide d'une micro-pipette sèche, prélever 0,05 cm³ de sang et le porter dans un tube contenant 5 cm³ d'eau distillée. Ajouter 1 cm³

de solution fraîchement préparée de ferricyanure de potassium à 10 p. 100. Agiter délicatement. Centrifuger la solution de méthémoglobine obtenue (10 minutes à 6.000 tours minute) ou filtrer (papier Durieux bleu n° 111 à filtration lente) pour éliminer les leucocytes et les stromas. Préparer également un tube contenant les réactifs seuls (5 cm³ d'eau distillée et 1 cm³ de solution de ferricyanure de potassium). Mesurer au photocolorimètre (cuve de 1 cm., filtre bleu-vert, longueur d'onde 500 mμ) la densité optique des deux solutions ; déduire de la valeur trouvée pour l'essai la valeur obtenue pour les réactifs seuls. Nous avons utilisé le spectrophotomètre de Pulfrich.

Pour établir la courbe de référence, on utilise une solution d'hémoglobine pure cristallisée (141) dont on aura dosé le fer (0,335 g. de fer pour 100 g. d'hémoglobine) (91). Le graphique est une droite (les mesures étant exprimées en densité optique) passant par l'origine.

Nous avons vérifié la fidélité de cette méthode en l'appliquant au dosage de plusieurs prises d'essai de même sang. Par ailleurs, nous avons comparé les résultats de notre technique à ceux donnés par la méthode de référence, c'est-à-dire celle basée sur le dosage du fer (91). Les résultats obtenus nous ont montré que la précision de notre méthode était d'au moins ± 2 p. 100. Enfin la stabilité de la coloration obtenue par formation de méthémoglobine, sous l'action de ferricyanure de potassium ressort du fait que les mesures colorimétriques, effectuées sur les mêmes essais à 24 heures d'intervalle, donnent des résultats superposables à 1 p. 100 près.

5° Valeur globulaire.

Nos résultats sont exprimés en valeur globulaire absolue qui représente la quantité d'hémoglobine contenue dans une hématie. On calcule cette valeur en divisant le poids d'hémoglobine par mm³ de sang par le nombre des globules rouges présents dans le même volume. De ce fait, le résultat se trouve être exprimé en micromicrogrammes d'hémoglobine par hématie (1 μ μ g. = 10⁻¹² g.).

6° Réticulocytes.

Pour le dénombrement des réticulocytes, nous avons employé la méthode de Fiessinger et Laur au violet vital qui est une solution saturée d'un mélange de deux parties

de bleu de crésyl brillant et d'une partie de rouge neutre dans l'alcool absolu. Une goutte de colorant est mise à sécher sur la lame, on laisse tomber dessus une goutte de sang, on recouvre d'une lamelle, on mélange en soulevant plusieurs fois la lamelle, on étale sur le reste de la lame après 5 minutes de contact. A l'examen à l'immersion, les hématies sont colorées en rose pâle et la substance granulo-filamenteuse en mauve bleu foncé.

II. — CARACTERES DE L'ANEMIE OBTENUE PAR INANITION PROTEIQUE PROLONGEE CHEZ LE RAT BLANC ADULTE

1° Données hématologiques relatives aux animaux normaux.

Avant de donner nos résultats expérimentaux, nous tenons à présenter quelques données relatives aux animaux normaux de notre élevage. Celles-ci sont résumées dans le tableau n° 1 et sont accompagnées du poids de l'animal.

TABLEAU 1. — *Nombre des hématies (N) et hémoglobine (H) par mm³ de sang ; valeur globulaire (H/N) et taux des reticulocytes (R) chez le rat normal adulte de poids (P).*

RAT n°	Poids (P) g.	Hématies p. mm ³ (N) n x 10 ⁶	Hémoglobine p. mm ³ (H) μ g.	Valeur globulaire (H/N) μ μ g.	Reticulo- cytes (R) hématies p. 100
1	172	8,62	176	20,4	0
2	144	8,20	151	18,4	3
3	168	8,92	178	20,0	0,5
4	175	8,60	168	19,5	3
5	160	8,60	170	19,8	1
6	203	7,60	149	19,6	2
7	189	8,50	175	20,6	1
8	191	8,12	162	20,0	2
9	152	8,76	165	18,8	2
10	186	8,70	162	18,6	3
11	214	9,00	171	19,0	2
12	164	8,80	173	19,7	2
moyenne	176,5	8,70	167	19,5	1,8

De l'examen du tableau n° 1 il ressort que le sang des rats adultes normaux de notre élevage présente les caractères suivants :

a) le nombre des hématies (N) par millimètre cube est compris entre 8 et 9 millions ;

b) le taux d'hémoglobine (H) par millimètre cube varie suivant les animaux aux environs de 165, 170 μg. ;

c) la valeur globulaire (H/N) est de l'ordre de 19,5 μ μg. ;

d) le sang ne présente jamais un taux de réticulocytes (R) supérieur à 3 p. 100 d'hématies.

2° Etude de l'anémie expérimentale par inanition protéique.

Ce sont les animaux de cet élevage qui ont été utilisés pour étudier l'évolution dans le temps de l'anémie provoquée par inanition protéique. Pour cela, nous avons administré à une série de rats le régime dépourvu d'azote préparé comme il a été indiqué plus haut (page 52) Nous avons ensuite examiné régulièrement le sang de ces animaux selon les techniques indiquées antérieurement. Dans le tableau II sont rassemblés quelques-uns des résultats de cette expérience, relatifs aux variations du poids (P), du nombre des hématies (N), de la concentration en hémoglobine (H), de la valeur globulaire (H/N), du taux des réticulocytes (R.).

TABLEAU II. — Variation en fonction du temps, du poids des animaux, et du nombre des hématies, de la concentration en hémoglobine, de la valeur globulaire, du taux des réticulocytes de leur sang, au cours de l'inanition protéique.

Temps en jours d'inani- tion protéine	Poids (P) g.	Hématies (N) p. mm ³	Hémoglobine (H) p. mm ³ μ g.	Valeur globulaire (H/N) μ g.	Réticulo- cytes (R) p. 100 hématies
RAT n° 21					
1	185	8,40	164,0	19,5	2
5	180	8,00	156,0	19,5	2
10	175	7,60	152,0	20,0	3
15	154	7,25	148,5	20,5	3
20	138	6,40	147,0	23,0	2
25	130	6,00	146,5	24,4	2,5
30	122	5,00	142,0	28,2	2
35	115	4,28	134,0	31,2	2
RAT n° 22					
1	180	8,00	160,0	20,0	0
5	178	7,80	156,0	20,0	0,5
10	172	7,62	155,0	20,4	0
15	147	7,10	152,0	21,2	0
20	126	6,13	147,0	24,0	0,5
25	110	5,34	138,0	25,9	1
30	102	4,84	135,0	28,0	1
35	98	4,26	133,0	31,2	0,5

Temps en jours d'inani- tion protéique	Poids (P) g.	Hématies (N) p. mm ³ n x 10 ⁶	Hémoglobine (H) p. mm ³ μ g.	Valeur globulaire (H/N) μ μ g.	Réticulo- cytes (R) p. 100 hématies
RAT n° 25					
1	168	8,04	159,0	19,8	0,5
5	168	7,92	158,0	20,0	1
10	150	6,95	149,5	21,5	1
15	140	6,22	153,0	24,6	1
20	121	5,85	155,0	26,5	1
25	106	5,30	148,5	28,0	1
30	101	4,72	140,0	29,6	1
35	97	4,20	132,0	31,4	1
RAT n° 26					
1	165	8,60	160,0	18,6	3
5	159	7,90	148,5	18,8	3
10	153	7,20	134,0	18,6	3
15	144	6,70	130,0	19,4	2,5
20	132	6,00	135,0	22,5	2,5
25	128	5,12	132,0	25,9	3
30	106	4,70	129,0	27,4	3
35	101	4,26	130,0	30,4	2,5
RAT n° 27					
1	203	7,50	142,0	19,0	2
5	192	7,00	134,0	19,2	2
10	175	6,60	129,0	19,6	2
15	172	6,10	141,5	23,1	1,5
20	157	5,40	148,5	27,5	2
25	145	4,92	145,5	29,6	2
30	135	4,36	131,0	30,0	2
35	129	3,96	128,0	32,3	2
RAT n° 30					
1	168	8,60	170,0	19,8	1
5	166	8,00	163,0	20,4	1
10	160	7,30	157,0	21,5	1
15	143	6,20	151,0	24,4	1
20	140	5,50	147,0	26,0	1
25	134	4,72	125,0	26,5	1
30	124	4,70	127,0	27,0	1,5
35	111	4,02	111,0	27,6	1

De l'examen du tableau II il ressort qu'au départ du régime dépourvu d'azote, le nombre des hématies est compris, comme nous l'avons déjà vu, entre 8 et 9 millions. Une quinzaine de jours s'écoulent sans qu'il subisse d'importantes variations. A partir de ce temps il baisse de

plus en plus rapidement, jusqu'à 4 millions (et même au-dessous), valeur atteinte au bout de 30 à 35 jours. La perte de poids est alors considérable et atteint en moyenne 40 p. 100. La diminution du taux de l'hémoglobine est nette mais cependant moins marquée que la perte de poids ou la chute du nombre des hématies. La valeur globulaire, initialement très voisine de $19,5 \mu \mu\text{g.}$, reste constante pendant les 15 premiers jours. Dans la plupart des cas, elle croît ensuite pour atteindre fréquemment $25 \mu \mu\text{g.}$, et plus, aux environs des 30 à 35 jours d'expérience. Le taux des réticulocytes ne présente aucune variation appréciable. La mort de l'animal survient aux environs du 45^e jour d'inanition protéique, alors que le nombre des hématies a encore légèrement baissé au voisinage de 3 millions et que la valeur globulaire demeure toujours élevée.

La moyenne des résultats obtenus est rapportée dans la figure n° 1.

Nous retiendrons essentiellement de ces résultats les faits suivants : au bout de 30 à 35 jours d'inanition protéique, il apparaît chez les rats blancs adultes une anémie importante. Le nombre des hématies tombe à une valeur inférieure de 50 p. 100 à sa valeur initiale ; la valeur globulaire s'élève considérablement ; on ne note aucune variation intéressante du taux des réticulocytes.

Discussion des résultats. — On remarque immédiatement que nous obtenons une anémie hyperchrome, alors qu'ASHKENASY obtient une anémie hypochrome (4). A notre sens, ce désaccord réside dans certaines différences existant entre les régimes mis en œuvre. Dans le nôtre, nous apportons les vitamines A et D sous forme d'huile de foie de morue et les vitamines B₁, B₂ et PP à l'état de corps purs. Les doses sont celles réputées couvrir les besoins des animaux et nous n'en apportons pas en excès. ASHKENASY prépare son régime en saccharifiant l'amidon par un « extrait concentré de malt ». Or nous avons vu que les céréales germées contiennent le facteur extrinsèque de Castle (158) et l'on sait, par ailleurs, qu'elles sont riches en l'ensemble des vitamines du groupe B dont l'acide folique fait partie. Notre régime, qui apporte les vitamines aux doses juste nécessaires à la couverture des besoins des rats, est donc plus sévèrement carencé que celui d'ASHKENASY qui contient en excès des vitamines du groupe B. Cela nous paraît de nature à expliquer la diffé-

rence de caractères des anémies obtenues à la suite de l'administration de ces régimes.

L'anémie obtenue chez le rat blanc par l'administration de notre régime est donc, en résumé, une anémie intense de caractère en général hyperchrome dans les conditions où nous nous sommes placés.

Nous nous sommes dès lors demandé si les animaux ainsi préparés ne pourraient pas servir de réactifs pour l'essai de l'activité des extraits hépatiques.

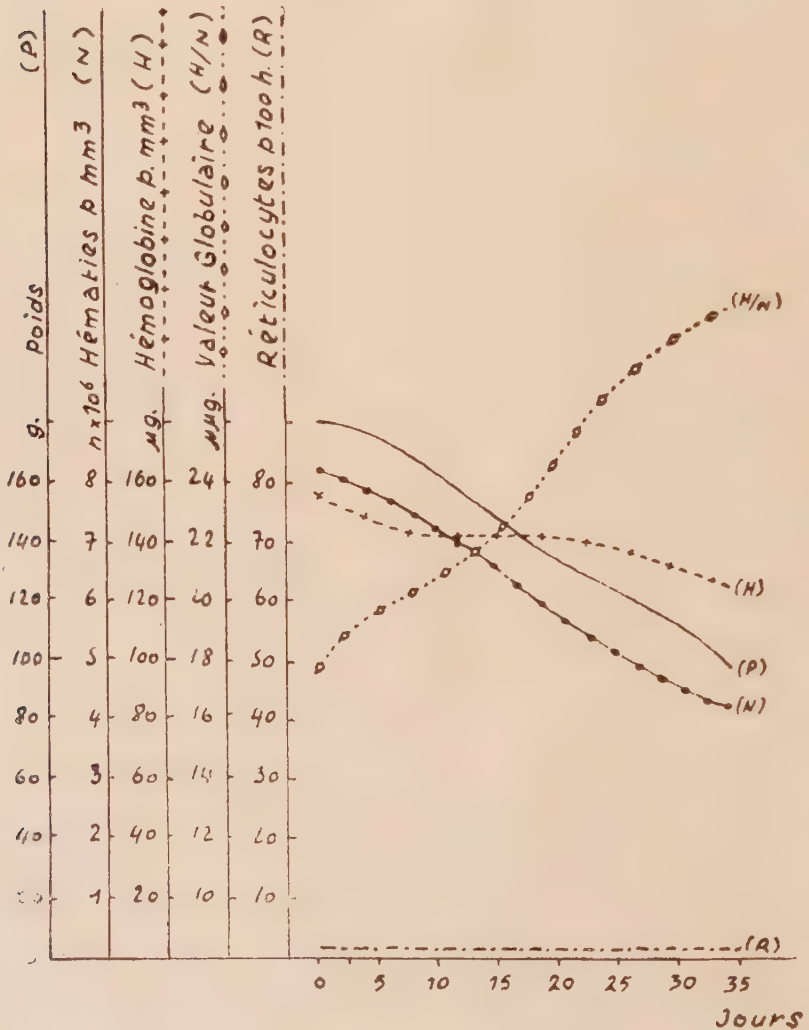


FIGURE 1. — Variation en fonction du temps, du poids des animaux et du nombre des hématies, de la concentration en hémoglobine, de la valeur globulaire du taux des réticulocytes de leur sang, au cours de l'inanition protéique (moyenne des résultats obtenus pour six rats).

III. — ACTION DES EXTRAITS HEPATIQUES RECONNUS ACTIFS DANS L'ANEMIE PERNICIEUSE SUR LES RATS ANEMIES PAR INANITION PROTEIQUE PROLONGEE

Dans les expériences qui suivent, nous allons juger des effets des extraits hépatiques, reconnus actifs dans l'anémie pernicieuse humaine, sur l'anémie expérimentale réalisée ainsi que nous l'avons décrit ci-dessus. Les extraits de foie que nous avons utilisés pour nos essais sont des produits commercialisés en Amérique, titrés en unités cliniques suivant les méthodes exigées dans la Pharmacopée des Etats-Unis. Ceux que nous avons mis en œuvre titrent 10 unités cliniques (U.S.P.) par cm^3 . Nous rappelons ici que l'unité (U.S.P.) est la plus petite quantité de substance qui, donnée journellement pendant 15 jours à un biermérien vierge de tout traitement, produit une réponse hématopoïétique satisfaisante (poussée réticulocytaire, augmentation du nombre des hématies et du taux de l'hémoglobine) (43).

1° Essai qualitatif.

Dans une première série d'essais, nous avons injecté 1 cm^3 d'une dilution à 1/100^e des extraits d'origine américaine, c'est-à-dire une dose équivalente à 0,1 unité clinique (U.S.P.) à des rats préalablement soumis à l'inanition protéique pendant une durée de 30 jours. Après cette injection unique, les animaux sont maintenus à l'inanition azotée. Leur sang est examiné chaque jour selon les techniques indiquées antérieurement. Les résultats obtenus sont contenus dans le tableau n° III, relatif à 5 animaux pris parmi les 60 rats ayant servi à cette expérience.

TABLEAU III. — *Modifications sanguines consécutives à l'injection de 0,1 unité (U.S.P.) d'extrait de foie à des rats anémisés par inanition protéique prolongée.*

Observations hématologiques	RAT n°	Après 30 j. d'ina- nition protéique.	Jours après l'injection d'extrait hépatique					
			2	4	5	7	10	12
Hématies (N)	78	4,10	4,15	4,35	4,20	4,00	3,85	3,45
	90	4,30	4,20	4,25	4,25	3,80	3,60	3,20
	92	4,60	4,44	4,35	4,46	4,45	4,45	4,44
p. mm ³ n x 10 ⁶	104	3,74	3,70	3,80	4,00	3,70	3,56	3,20
	110	4,84	4,82	4,82	4,73	4,50	3,10	2,85
Hémoglob. (H)	78	116,5	112,0	96,0	71,5	96,0	114,5	110,0
	90	115,0	101,0	91,0	68,0	84,0	88,0	83,0
	92	123,0	105,5	91,0	78,5	98,0	116,0	124,0
p. mm ³ µ g.	104	105,0	103,5	73,0	65,0	79,0	84,5	77,0
	110	135,0	135,0	92,5	76,5	96,0	74,0	68,5
Valeur globulaire (H/N) µ µ g.	78	28,5	27,0	22,0	17,0	24,0	29,0	32,0
	90	26,8	24,0	21,4	16,0	22,0	24,5	26,0
	92	27,4	23,8	21,0	17,6	22,0	26,1	28,0
	104	28,0	28,0	19,2	16,2	21,4	23,8	24,0
	110	28,6	28,5	22,0	16,2	17,0	22,0	24,2
Réticulocytes (R)	78	1,5	4	12,5	22	71	8	4
	90	2	9	9	19	67	3	1
	92	2	5	22	31	16	4	4
	104	1	2	12	15	10	3	1
p. 100 hématies	110	2	3	25	28	16	12	6

De l'examen du tableau n° 3, il ressort que : à la suite de l'injection unique, à la dose de 0,1 unité clinique (U.S.P.) d'un extrait hépatique américain reconnu actif dans l'anémie pernicieuse, on observe chez le rat adulte, anémié par inanition protéique prolongée et maintenu à ce régime, les réactions hématologiques suivantes :

a) un ralentissement marqué de la chute du nombre des hématies (on observe même parfois une légère quoique

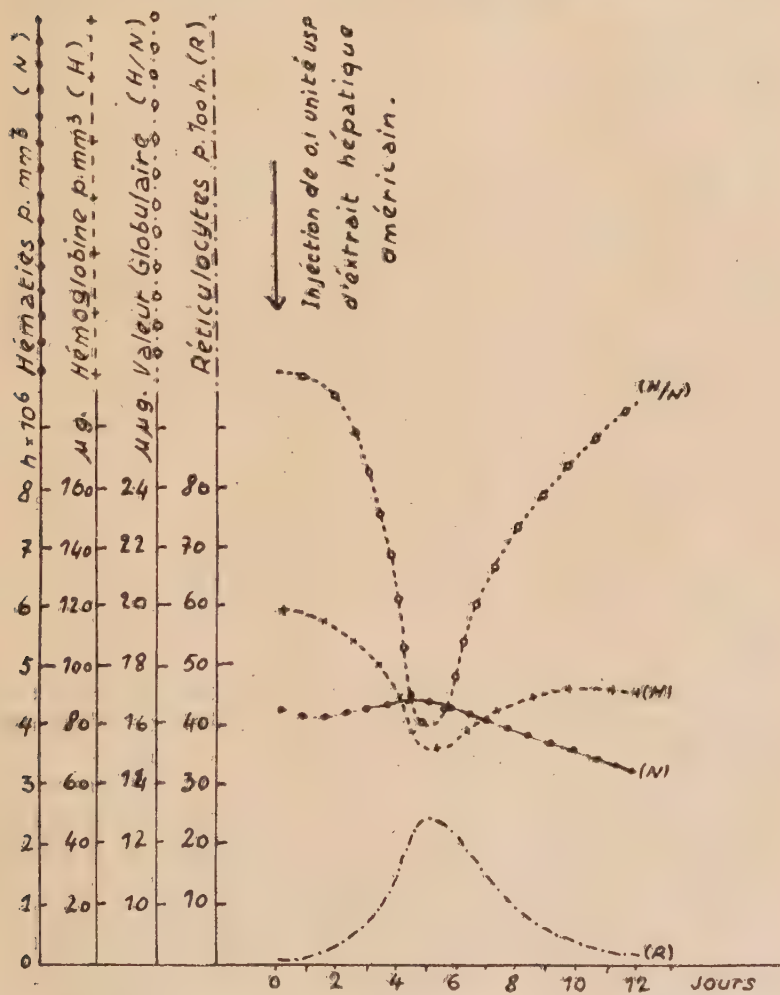


FIGURE 2. — Modifications sanguines consécutives à l'injection de 0,1 unité clinique (U.S.P.) d'extrait de foie à des rats anémiés par inanition prolongée (moyenne des résultats obtenus pour cinq rats).

passagère augmentation du nombre des globules rouges). Par la suite, on note une diminution accélérée du nombre des hématies ;

b) une accélération sensible de la baisse du taux de l'hémoglobine, qui passe par une valeur minima 5 jours après l'injection. Ce taux s'élève ensuite légèrement pour reprendre sa lente diminution le 7^e jour après l'injection ;

c) une chute importante de la valeur globulaire qui atteint le 5^e jour après l'injection un minimum en général très inférieur à la normale. Puis elle s'élève à nouveau rapidement, l'anémie tendant à reprendre son caractère hyperchrome ;

d) une crise réticulocytaire extrêmement nette au cours de laquelle le taux des réticulocytes atteint 15 à 30 p. 100 du nombre des hématies. Son maximum d'intensité s'observe également le 5^e jour après l'injection.

De ces quatre réactions hématologiques, trois sont extrêmement nettes, à savoir le ralentissement passager de la perte des hématies, la chute de la valeur globulaire et la crise réticulocytaire. Afin de faciliter par la suite leur énumération, nous appellerons conventionnellement :

Réaction A : le ralentissement passager de la chute du nombre des hématies.

Réaction B : toute chute importante de la valeur globulaire.

Réaction C : une crise réticulocytaire nette.

La moyenne des résultats obtenus est rapportée dans la figure n° 2.

Ces réactions doivent être considérées comme résultant de l'excitation de l'hématopoïèse sous l'effet de l'extrait hépatique injecté. Ajoutons qu'on note, après cette excitation passagère, chez l'animal maintenu à l'inanition protéique, une aggravation de l'évolution de l'anémie, comme permet déjà de le prévoir l'accélération de la chute du nombre des hématies observée après le 5^e jour de l'injection unique d'un extrait hépatique cliniquement actif. Nous avons cependant tenu à vérifier cette observation en procédant à l'expérience suivante : après la disparition des réactions hématologiques provoquées par une injection de 0,1 unité clinique (U.S.P.) d'extrait hépatique, c'est-à-dire 7 jours après cette première injection,

TABLEAU IV. — Modifications sanguines consécutives à deux injections à sept jours d'intervalle de 0,1 unité U.S.P. d'extrait de foie à des rats anémiés par inanition protéique.

Observations hématologiques	RAT n°	Après 30 jours d'inanition protéique	7 jours après la 1 ^{re} injection d'extrait hépatique	Jours après la 2 ^{me} injection d'extrait hépatique			
				1	2	3	4
Hématies p. mm ³ (N) n x 10 ⁶	112	4,26	3,40	2,46	2,32	mort	mort
	114	5,00	4,90	4,04	3,40	2,80	
	120	5,04	4,44	3,34	3,12	mort	
Hémoglobine p. mm ³ (H) µ. g.	112	94,0	73,5	52,5	26,0	mort	mort
	114	122,0	103,0	73,5	55,0	37	
	120	121,0	106,0	80,0	56,0	mort	
Valeur globulaire (H/N) µ µ. g.	112	22,0	21,6	21,4	11,0	mort	mort
	114	24,4	21,4	18,2	16,2	13,2	
	120	24,2	24,0	24,0	18,0	mort	
Réticulocytes (R) p. 100 hématies	112	2	4	5	13	mort	mort
	114	0	7	7	10	12	
	120	3	10	8	12	mort	

nous avons pratiqué sur les mêmes animaux une deuxième injection identique à la première. Nous avons obtenu les résultats suivants :

De l'examen du tableau n° IV il ressort que : une deuxième injection d'extrait de foie actif chez le biernérien provoque chez le rat anémié par inanition protéique les mêmes réactions hématologiques que celles consécutives à la première injection (réactions A, B et C). Le maximum de leur intensité s'observe cependant plus précocement, soit le 3^e jour après cette deuxième injection.

Discussion des résultats. — Après la première injection d'extrait hépatique, nous avons déjà noté une aggravation de l'anémie chez le rat. Après la deuxième injection, cette aggravation est telle qu'elle hâte considérablement la mort des animaux.

Le fait le plus remarquable réside en ce que la mort résulte, non seulement de la prolongation de l'inanition protéique, mais d'une accentuation soudaine des signes de l'anémie. Rappelons que l'extrait hépatique que nous avons utilisé contient certainement une substance capable d'agir sur la multiplication des hématies. Dans nos expériences, cette activité est bien mise en évidence par les réactions hématologiques que nous observons et en particulier par l'importance de la crise réticulocytaire. Celle-ci témoigne de la formation d'hématies nouvelles. Les jeunes hématies apparaissant ainsi ne peuvent être élaborées vraisemblablement qu'avec des réserves extrêmement limitées car nous ne fournissons aux rats aucun apport de matériel protéique. Aussi ne faut-il pas s'étonner de voir par la suite le nombre des globules rouges diminuer. Ceci s'explique par le fait que sous l'effet de l'action excitante des extraits de foie l'animal a répondu en épuisant ses toutes dernières réserves protéiques. Il est même logique de penser que les nouvelles hématies qui se sont formées l'ont été à partir de matériaux résultant de la destruction de celles pré-existantes. On conçoit que ce dernier mécanisme s'accompagne inévitablement d'une usure importante qui se traduit en fin de compte par une aggravation de l'anémie et même par la mort de l'animal.

En résumé, l'extrait hépatique, reconnu actif dans l'anémie pernicieuse humaine, se révèle également actif

dans l'anémie expérimentale provoquée chez le rat par inanition protéique prolongée.

Dès lors il devient intéressant de rechercher quelle est la dose minima d'extrait hépatique qui permet de provoquer l'ensemble des réactions hématologiques étudiées précédemment dans les mêmes conditions.

2° Essai quantitatif.

Dans ce but, nous avons injecté des doses décroissantes des extraits hépatiques d'origine américaine et titrés en unités cliniques (U.S.P.) à des rats, préalablement anémiés par une longue période d'inanition protéique (30 jours) et maintenus à ce même régime après l'injection unique du produit mis en œuvre. Nous avons ainsi injecté par animal 1 cm³ des dilutions suivantes d'extrait américain : 1/1.000^e, 1/2.500^e, 1/5.000^e, 1/7.500^e, 1/10.000^e, ces doses apportant respectivement une quantité d'extrait équivalente à 1/100^e, 1/250^e, 1/500^e, 1/750^e et 1/1.000^e d'unités cliniques (U.S.P.). Le sang de ces animaux a été examiné immédiatement avant et 5 jours après l'injection selon les techniques indiquées antérieurement.

Le tableau n° V rend compte des résultats obtenus à la suite d'une expérience de ce type.

TABLEAU V. — Réactions hématologiques obtenues par l'injection de doses variables d'extrait hépatique à des animaux anémisés par inanition protéique.

RAT n°	Dose injectée unités USP	Hématies par mm ³ (N)		Hémoglobine p. mm ³ (H) μ g.		Valeur globulaire (H/N) μ gr.		Réticulocytes (R) p. 100 hématies	
		avant	après (°)	avant	après	avant	après	avant	après
130	1/100°	4,05	3,95	105,0	67,0	26,0	17,0	1,5	23
142	1/100°	4,20	4,30	115,0	86,0	27,4	20,0	0,5	18
143	1/250°	4,84	4,59	132,0	76,0	27,4	16,6	1	35
145	1/250°	4,48	4,60	115,0	83,0	25,6	18,0	2,5	20
151	1/500°	4,56	4,25	115,0	73,0	25,2	17,2	2	41
163	1/500°	5,12	4,76	146,0	77,0	28,6	16,2	3	28
164	1/750°	4,55	4,36	114,0	112,0	25,1	25,7	2	3
165	1/750°	5,20	4,08	124,0	110,0	24,8	27,0	1,5	0,5
167	1/1000°	3,90	3,78	110,5	110,0	28,4	29,2	0,5	3
170	1/1000°	4,88	4,68	118,0	114,0	24,2	24,4	1,5	2

(*) Immédiatement avant, et cinq jours après l'injection.

Il ressort de l'examen du tableau n° V que jusqu'à la dose d'extrait hépatique correspondant à une activité clinique de 1/500^e d'unité U.S.P. on note une activité biologique manifeste qui se traduit surtout par l'importance des réactions A, B et C. Par contre, les doses correspondant à une activité de 1/750^e et 1/1.000^e d'unité U.S.P. s'avèrent impuissantes à provoquer des réactions hématologiques nettement appréciables.

Discussion des résultats. — D'après ces résultats, il semble logique de fixer aux environs de 1/500^e d'unité clinique U.S.P. le seuil d'activité de l'extrait hépatique utilisé chez le rat anémié par inanition protéique.

Par conséquent, on peut définir une unité rat (U.R.) comme étant la dose minima capable de produire, dans les conditions où nous nous sommes placés, une réponse hématologique satisfaisante (réactions A, B et C) et correspondant à une activité clinique de 1/500^e d'unité U.S.P.

En résumé, l'injection d'extrait hépatique actif chez le biermérien provoque, chez le rat anémié par inanition protéique prolongée, un ensemble de réactions sanguines (ralentissement passager de la perte des hématies, ou réaction A ; nette chute de la valeur globulaire ou réaction B ; importante crise réticulocytaire ou réaction C). Il est également possible de déterminer la dose minima d'extrait hépatique capable de produire de tels effets. Cette dose peut servir à définir l'Unité-Rat. Nos résultats permettent d'établir que l'unité clinique U.S.P. équivaut à environ 500 de nos Unités-Rats.

Les données que nous venons d'établir nous permettent donc de proposer un test biologique de l'activité des extraits de foie, basé sur l'observation des réactions hématologiques du rat anémié par inanition protéique prolongée. Nous avons vu ci-dessus les conditions techniques de réalisation de ce test.

3° Mode opératoire.

On place dans des cages individuelles des rats blancs adultes d'un poids compris entre 150 et 200 g. ; on effectue sur ces animaux les déterminations hématologiques suivantes : numération des globules rouges ; dosage de l'hémoglobine ; calcul de la valeur globulaire (p. 54)

Les animaux sont alors maintenus pendant 30 jours à un régime strictement dépourvu de protides (p. 52). Durant cette période, les rats sont pesés tous les 5 jours.

Au bout de cette période, l'anémie doit être sévère, ce que l'on constate par la perte de poids des animaux (40 p. 100 de leur poids initial), la diminution du nombre de leurs hématies (50 p. 100 de la valeur initiale) et l'augmentation sensible de leur valeur globulaire.

Si tel n'est pas le cas, les rats sont maintenus à l'inanition protéique pendant 5 jours de plus.

On injecte alors aux animaux l'extrait hépatique à essayer, à une dose convenable (rappelons que l'unité clinique U.S.P. équivaut à environ 500 de nos unités-rats).

Immédiatement avant et 5 jours après l'injection, on effectue les examens hématologiques suivants : numération des globules rouges, dosage de l'hémoglobine, calcul de la valeur globulaire, numération des réticulocytes (p. 52).

La nette observation des réactions A (ralentissement de la chute du nombre des hématies), B (nette chute de la valeur globulaire) et C (importante crise réticulocytaire) témoigne de l'activité des extraits hépatiques, à la dose injectée.

IV. — ETUDE DE LA SPECIFICITE DU TEST BIOLOGIQUE PROPOSE VIS-A-VIS DU FACTEUR HEPATIQUE ANTIPERNICIEUX

La question la plus délicate à discuter est celle de la spécificité du test que nous proposons. A priori, il ne saurait être question d'une spécificité absolue vis-à-vis du facteur hépatique antipernicieux car l'anémie expérimentale par inanition protéique ne peut être identifiée à l'anémie pernicieuse humaine. Nous avons cependant essayé de préciser les limites de cette spécificité, c'est-à-dire de savoir jusqu'à quel point il nous était permis de considérer notre test comme spécifique.

La nature des réactions que nous avons obtenues par l'injection au rat anémié par inanition protéique prolongée, d'une quantité convenable d'extrait de foie, plaide déjà en faveur de la spécificité de ce test : ces réactions, en effet, sont spécifiquement hématologiques, elles sont le signe d'une action des extraits hépatiques sur l'hématopoïèse.

Cependant, nous nous sommes demandé si de telles réactions hématologiques étaient provoquées uniquement par le ou les facteurs antipernicieux présents dans les extraits hépatiques, ou bien si elles pouvaient se manifester en injectant au rat, anémié par inanition protéique prolongée, soit des substances quelconques, soit des substances connues et douées d'activité relativement à certaines étapes de l'hématopoïèse.

Dans le but de répondre à cette question, nous avons anémié un lot important de rats par une longue période d'inanition protéique, suivant la technique décrite précédemment. Nous avons utilisé les animaux ainsi préparés à l'essai des substances suivantes : extrait de muscle, acides aminés hématogènes, sel de fer, sel de cuivre, acide folique, vitamine B₁₂. Nous avons injecté aux rats anémiés ces

diverses substances, à des doses que nous préciserons par la suite.

a) *Extrait de muscle*. — Nous avons utilisé cet extrait en tant que substance quelconque n'ayant aucune activité reconnue dans l'hématopoïèse. Pour cela, nous avons préparé un extrait de muscle de bœuf. Nous avons utilisé la méthode de COHN en substituant dans celle-ci le muscle au foie. La dose injectée par animal est de 1 cm³, correspondant à 5 g. de muscle frais.

b) *Acides aminés hématogènes*. — Certains acides aminés (glycocolle, histidine, méthionine, tryptophane) sont nécessaires à une hématopoïèse normale. Il nous a donc paru intéressant d'étudier les effets provoqués chez le rat, dans les conditions de notre test, par l'administration de ces acides aminés hématogènes. Au lieu de les employer séparément, nous avons préféré faire appel à un hydrolysât de protéine les contenant. Nous avons préparé un hydrolysât de caséine suivant la méthode de ELLMAN (66) par hydrolyse sulfurique. La dose injectée par animal est de 1 cm³ d'une solution à 5 p. 100 d'hydrolysât de caséine.

c) *Fer, cuivre*. — En raison du rôle important joué par ces métaux dans l'hématopoïèse, nous avons injecté par animal 1 cm³ d'une solution de sel de fer et 1 cm³ d'une solution de sel de cuivre apportant respectivement 1 mg. de fer et 0,1 mg. de cuivre.

d) *Acide folique*. — Nous avons vu que l'acide folique ne pouvait être considéré comme le facteur hépatique antipernicieux mais qu'il était cependant doué d'activité dans l'anémie pernicieuse à condition d'être administré à des doses très élevées (100 mg. par jour chez l'Homme). Il nous a donc paru très intéressant d'étudier l'action de cette substance dans le cadre de cette expérience. Nous avons donc injecté par animal une solution d'acide folique à la dose de 1 cm³ apportant 2 mg. de cette substance.

Comme on peut le voir, toutes ces substances ont été injectées aux animaux à des doses infiniment élevées pour un rat.

e) *Vitamine B₁₂*. — Pour la vitamine B₁₂, nous avons tenu à procéder de façon plus précise que pour les expériences précédentes. En effet, cette vitamine est incontestablement active dans l'anémie pernicieuse humaine. Certains auteurs la considèrent même comme étant le

principe antipernicieux du foie. Nous avons injecté aux animaux des doses croissantes de vitamine B₁₂, soit 0,002, 0,01, 0,1, 1 µg. de cette vitamine par rat.

f) Enfin, à titre d'expérience de contrôle, 1 lot de rats recevait une injection de 1 unité-rat d'extrait de foie par animal. L'extrait hépatique que nous avons utilisé ici comme au cours de tout notre travail est d'origine américaine, il titre 10 unités cliniques (U.S.P.) par cm³. Pour donner à un animal l'équivalent de 1 unité-rat, soit 1/500^e d'unité (U.S.P.), nous avons injecté par rat 1 cm³ d'une dilution à 1/5.000^e de cet extrait.

Après l'injection de ces diverses substances, les rats ont été maintenus à l'inanition protéique. Leur sang a été examiné suivant les techniques décrites antérieurement, immédiatement avant et 5 jours après l'injection.

Le tableau n° VI contient quelques exemples des réponses hématologiques obtenues respectivement pour les diverses séries d'animaux

TABLEAU N° VI. — Réactions hématologiques provoquées chez le rat anémié par inanition protéique prolongée à la suite d'injection : d'extrait hépatique, d'extrait de muscle, d'hydrolysate de caséine, de sel de fer, de sel de cuivre, d'acide folique ou de vitamine B₁₂.

RAT n°	Hématies p. mm ³ (N)		Hémoglobine par mm ³ (H)		Valeur globulaire (H/N)		Réticulocytes (R)	
	avant	après (°)	avant	après	μ gr.	avant	avant	après
1° Injection de 1/500* d'unité USP (soit 1 unité Rat) d'extrait de foie américain.								
174	5,20	5,32	115,0	56,0	22,1	10,5	2	32
175	4,00	4,00	76,5	38,0	19,1	9,5	1	25
210	5,00	5,22	117,0	74,0	23,4	14,2	2	20
211	5,20	5,54	129,0	88,0	24,8	15,9	1	30
2° Injection d'extrait correspondant à 5 gr. muscle de bœuf.								
178	4,68	4,65	124,5	125,5	26,6	27,0	2	2
179	4,42	4,40	99,0	103,0	22,2	23,4	1	1
3° Injection de 1 cm ³ d'hydrolysate de caséine à 5 p. 100.								
186	5,34	5,10	141,0	138,5	26,4	27,2	1	0,5
187	4,84		97,0	95,0	20,0	21,1	1	1
4° Injection de 1 mgr. de fer.								
193	4,26	4,06	94,0	89,5	22,0	22,0	0	0
194	5,04	5,00	113,0	115,0	22,4	23,0	1	1

(*) Immédiatement avant et cinq jours après l'injection

RAT n°	Hématies p. mm ³ (N) n x 10 ⁶		Hémoglobine par mm ³ (H) μ gr.		Valeur globulaire (H/N) μ gr.		Réticulocytes (R) p. 100 hématies	
	avant	après	avant	après	avant	après	avant	après
5° Injection de 0,1 mgr. de cuivre.								
198	4,36	4,00	119,0	112,0	27,4	28,0	1	1
199	4,02	4,00	96,0	105,0	24,0	26,2	2	1,5
6° Injection de 2 mgr. d'acide folique.								
204	4,64	4,40	94,5	93,0	20,4	21,1	0	0
206	4,20	4,20	95,0	96,0	22,6	23,0	2	1
7° Injection de 0,002 μ gr. de vitamine B ₁₂ .								
216	5,80	5,20	120,0	110,0	20,7	21,2	0	0,5
217	5,02	4,60	101,0	102,0	20,2	22,1	1	1
8° Injection de 0,01 μ gr. de vitamine B ₁₂ .								
223	4,68	4,50	89,0	104,0	19,0	23,1	1	1,5
224	4,56	4,46	103,0	105,0	22,5	23,6	1	1
9° Injection de 0,1 μ gr. de vitamine B ₁₂ .								
230	5,32	4,64	116,0	104,0	20,9	22,4	2	1
231	4,90	4,76	106,0	117,0	21,7	24,6	1	1
10° Injection de 1 μ gr. de vitamine B ₁₂ .								
236	5,20	5,70	155,0	120,0	29,8	21,1	1	6
238	5,04	5,12	108,0	75,0	21,5	14,7	2	12

De l'examen du tableau n° VI il ressort que, en confirmation des expériences précédentes, les extraits de foie américains utilisés à la dose de 1 unité-rat ont provoqué nettement les réactions A, B et C, témoignant de l'activité de ces extraits. Nous n'observons aucune réaction de ce type à la suite des injections d'extrait de muscle, d'acides aminés hématogènes, de sel de fer, de sel de cuivre ou d'acide folique. La vitamine B₁₂, administrée aux doses de 0,002, 0,01, 0,1 µg., s'est également révélée impuissante à provoquer une réaction hématologique. Par contre, nous voyons qu'après l'injection de 1 µg. de vitamine B₁₂, dose infiniment élevée pour un rat, nous obtenons une réponse hématologique satisfaisante et comparable à celle obtenue par l'administration de 1/500^e d'unité clinique (U.S.P.) d'extrait hépatique américain.

Discussion des résultats. — Ces résultats nous montrent que : nous avons observé comme toujours une parfaite concordance entre les résultats obtenus par notre test et l'activité antipernicieuse des extraits hépatiques utilisés.

L'injection d'une substance, telle qu'un extrait de muscle, n'est suivie d'aucun effet appréciable.

Des substances jouant un rôle important au cours de l'hématopoïèse, mais ne possédant aucune activité spécifiquement antipernicieuse, sont incapables de provoquer, même utilisées à des doses massives, les réactions hématologiques qui caractérisent l'activité des extraits hépatiques américains ; tel est le cas des acides aminés hématogènes, des sels de fer et des sels de cuivre.

Bien qu'injecté à la dose très élevée de 2 mg., l'acide folique n'a pas donné de meilleurs résultats. Ceci est en rapport avec le fait que l'acide folique quoique représentant un utile médicament des anémies n'est pas capable de guérir l'ensemble des troubles du biernérien.

Par contre, les résultats que nous obtenons avec la vitamine B₁₂ présentent un intérêt qu'il convient de souligner : en effet, nous avons vu que pour obtenir une réponse hématologique nettement positive il nous a fallu mettre en œuvre une quantité très élevée, soit 1 µg., de vitamine B₁₂, alors que ces mêmes réactions sont observées par l'injection d'une dose infiniment faible d'extrait hépatique américain.

Ces observations nous montrent qu'à des doses suffisamment élevées la vitamine B₁₂ peut provoquer dans les

conditions de notre test des réactions hématologiques caractéristiques. Or, la vitamine B₁₂ est reconnue douée d'une activité antipernicieuse indiscutable. De tels faits sont de nature à confirmer l'étroite spécificité du test que nous proposons car il nous apporte la preuve que seule une substance spécifiquement antipernicieuse, telle que la vitamine B₁₂, se révèle capable de provoquer une réponse hématologique nettement positive : une telle réponse est donc bien le propre d'une activité antipernicieuse. Pour obtenir des réactions appréciables, il nous a fallu utiliser une dose élevée de vitamine B₁₂ : ce fait est en accord avec les observations cliniques ; en effet, alors que les doses thérapeutiques préconisées en 1949 étaient de l'ordre du microgramme (40), elles sont passées aujourd'hui à des valeurs beaucoup plus élevées, de l'ordre de plusieurs centaines de µg.

Ces résultats nous montrent également qu'il est impossible de rapporter l'activité des extraits de foie à la vitamine B₁₂ qu'ils peuvent contenir. En effet, la dose injectée à un animal, soit 1 cm³ d'une dilution au 1/500^e d'un extrait commercial américain, ne saurait en aucune façon contenir 1 µg. de B₁₂.

En résumé, les extraits de foie et la vitamine B₁₂ sont les seules substances qui se sont révélées capables de provoquer les réactions hématologiques caractéristiques A, B et C et qui soient unanimement reconnues comme douées d'activité antipernicieuse.

Les autres substances (extrait de muscle, acides aminés hématogènes, sels de fer, sel de cuivre, acide folique) n'ont donné aucune réaction de ce type. A l'exception de l'extrait de muscle, celles-ci jouent des rôles divers dans l'hématopoïèse mais ne possèdent aucune activité marquée dans l'anémie de BIERMER.

Les résultats rapportés ici sont donc de nature à confirmer le degré élevé de spécificité du test biologique que nous proposons, basé sur l'observation des réactions hématologiques du rat anémié par inanition protéique prolongée.

Ces résultats nous autorisent également à conclure que le facteur hépatique antipernicieux est d'une nature différente de celle des substances que nous venons d'étudier, y compris la vitamine B₁₂.

DEUXIEME PARTIE

CONTRIBUTION A LA MISE AU POINT
DU CONTROLE BIOLOGIQUE DE LA PURIFICATION
DES EXTRAITS HÉPATIQUES

I. — CONTROLE BIOLOGIQUE DE LA PURIFICATION DES EXTRAITS HEPATIQUES

Nous avons vu que l'absence d'un test biologique pratique et suffisamment spécifique du facteur hépatique antipernicieux avait fortement freiné les recherches dans le but de purifier et de fractionner les extraits de foie.

Etant maintenant en possession d'un tel test, nous avons étudié dans cette partie de notre travail comment réagissait le rat anémié par inanition protéique à l'injection d'un extrait de foie plus ou moins purifié.

Dans ce but, comme il nous a été impossible de trouver des extraits hépatiques commercialisés répondant au besoin de nos expériences, nous avons préparé nous-même des extraits de foie, de plus en plus purifiés, suivant les méthodes classiques et principalement la méthode de COHN. Nous avons ensuite étudié l'action sur le rat de ces extraits aux stades successifs suivants de leur purification :

- a) Fraction A. — Après extraction à l'eau et coagulation des protéines par la chaleur.
- b) Fraction B. — Alcoosoluble (alcool à 70°).
- c) Fraction C. — Soluble dans l'alcool butylique n.
- d) Fraction D. — Précipitable par le sel de Roussin.

Les opérations successives de cette purification sont résumées dans le schéma suivant :

Foie cru haché, acidifié à $\text{pH} = 5$
on chauffe à 80°

Résidu insoluble

Extrait soluble (A)

On traite par l'alcool à 70°

Résidu insoluble

Extrait alcoosoluble (B)

On traite par l'alcool
butylique n

Résidu insoluble

Extrait soluble
dans l'alcool butylique n
(C)

On traite par le sel
de Roussin

Filtrat après précipitation
par le sel de Roussin

Précipité (D)

Tous les essais biologiques, que nous pratiquerons au cours de cette deuxième partie de notre travail, seront réalisés dans les conditions techniques précisées précédemment, c'est-à-dire que nous injecterons, à des doses que nous indiquerons par la suite, ces divers extraits à des rats anémiés par une période de 30 jours d'inanition protéique. Nous examinerons le sang des animaux immédiatement avant et 5 jours après cette injection unique suivant les techniques hématologiques précitées.

A titre d'expérience de contrôle, nous réserverons au cours de chacun des essais un lot de rats qui recevront une injection d'extrait hépatique américain à la dose équivalente à 1 unité-rat.

1° Etude de la fraction A.

Nous avons obtenu cette fraction en extrayant le foie à l'eau et en coagulant les protéines par la chaleur ; pour cela, nous avons haché une partie de foie de bœuf à laquelle nous avons ajouté deux parties d'eau. Nous avons acidifié soigneusement jusqu'à $\text{pH} = 5$ par addition d'acide acétique. Nous avons coagulé les protéines par un chauffage de 15 minutes à 80°C . Nous avons filtré et lavé abondamment le coagulum avec de l'eau chaude acidifiée ($\text{pH} = 5$). Nous avons concentré le filtrat et les eaux de lavage au bain-marie et sous pression réduite.

L'extrait ainsi préparé correspond aux extraits hépatiques buvables préparés suivant la méthode de COHN. Il est très peu purifié ; son taux d'azote est très variable suivant le degré de protéolyse du foie mis en œuvre : il varie généralement dans de larges proportions autour de 1,25 g. d'azote pour une quantité d'extrait correspondant à 100 g. de foie frais.

Nous avons préparé plusieurs échantillons d'extrait de foie suivant cette technique ; nous avons injecté aux rats des doses variables de ces divers échantillons.

Préparation n° 15 : injection d'une dose d'extrait correspondant à 500 mg. de foie frais.

Préparation n° 67 : injection de doses croissantes d'extrait correspondant respectivement à 30, 40, 50 mg. de foie frais.

Les résultats obtenus au cours de cette expérience sont contenus dans le tableau n° VII.

TABLEAU N° VII. — *Modifications sanguines consécutives à l'injection, à des doses variables, de la fraction A, ou à l'injection de 1 unité-rat d'extrait hépatique américain, à des rats anémisés par inanition protéique prolongée.*

RAT n°	Hématies p. mm ³ (N)		Hémoglobine par mm ³ (H)		Valeur globulaire (H/N)		Réticulocytes (R)	
	avant	après (°)	avant	après	μ gr.	avant	avant	après
1° Injection de 500 mgr. de foie (préparation n° 15 — fraction A).								
241	4,82	5,34	120	89	25,0	16,7	1	13
242	4,40	4,54	99	68	22,6	14,9	1	10
2° Injection de 30 mgr de foie (préparation n° 67 — fraction A).								
245	5,46	4,77	102,0	97,0	18,7	20,4	2	2
246	5,40	5,00	118,0	119,0	21,9	23,9	1	1,5
3° Injection de 40 mgr. de foie (préparation n° 67 — fraction A).								
247	4,55	5,78	98,5	75,0	22,6	13,0	2	25
248	5,04	6,00	108,0	86,0	21,4	14,3	2	10
4° Injection de 50 mgr. de foie (préparation n° 67 — fraction A).								
249	4,64	5,34	101,0	62,0	22,0	11,6	0	13
250	5,04	5,94	115,0	86,0	22,8	14,5	0	12
5° Injection de 1 Unité-Rat (extrait hépatique américain).								
255	5,70	6,00	121	93,0	21,2	15,5	2	20
256	4,64	5,50	96	71,0	20,7	12,8	1	14

(*) Immédiatement avant et cinq jours après l'injection.

De l'examen du tableau n° VII, il ressort que l'injection d'extrait hépatique très peu purifié (Fraction A) aux doses correspondant à 500 mg. de foie frais (préparation n° 15) et à 50 et 40 mg. (préparation n° 67) s'est révélée capable de provoquer les réactions hématologiques A, B et C. Ces réactions sont qualitativement comparables à celles obtenues par l'injection de 1 unité-rat d'extrait hépatique américain. Par contre, on n'observe aucune réaction de ce type après l'injection de la dose correspondant à 30 mg. de foie frais (préparation n° 67).

Ces résultats nous montrent que, même très impurs, les extraits de foie mis en œuvre sont aptes à provoquer des réactions hématologiques nettes et que, malgré les impuretés, il est possible de déterminer avec précision le seuil d'activité, chez le rat, de tels extraits.

2° Etude de la fraction B.

Pour préparer cet extrait, nous avons poursuivi la purification de la fraction A : nous avons ajouté à cette dernière un volume d'alcool convenable pour amener le titre final du mélange à 70° alcoolique. Nous avons laissé reposer une nuit ; nous avons ensuite filtré et lavé le précipité avec de l'alcool à 70°. Nous avons chassé l'alcool des filtrats et concentré l'extrait au bain-marie, sous pression réduite.

Nous nous sommes inspiré pour la préparation de la fraction B des méthodes de COHN et de ERDOES (68). La préparation de cette fraction se rapproche de celle de certains extraits injectables français.

L'extrait ainsi préparé est déjà beaucoup plus purifié que le précédent ; son taux d'azote a baissé au voisinage de 0,60 g. d'azote pour une quantité d'extrait correspondant à 100 g. de foie frais. Ce taux cependant varie largement suivant la nature du foie utilisé.

Nous avons également préparé plusieurs échantillons d'extraits correspondant à la fraction B. Nous avons injecté ces divers échantillons aux doses suivantes :

Préparation n° 19 : injection d'une dose correspondant à 500 mg. de foie frais.

Préparation n° 67 : injections de doses croissantes d'extrait correspondant respectivement à 30, 40, 50 mg. de foie frais

Les résultats que nous avons obtenus sont consignés dans le tableau n° VIII.

TABLEAU N° VIII. — *Modifications sanguines consécutives à l'injection, à des doses variables, de la fraction B ou à l'injection de 1 unité-Rat d'extrait hépatique américain à des rats anémiés par inanition protéique prolongée.*

RAT n°	Hématies p. mm ³ (N) n x 10 ⁶		Hémoglobine p. mm ³ (H) μ gr.		Valeur Globulaire (H/N) μ gr.		Réticulocytes (R) p. 100 hématies	
	avant	après (°)	avant	après	avant	après	avant	après
1° Injection de 500 mgr. de foie (préparation n° 19 — fraction B).								
260	4,54	4,94	97,0	66,0	21,4	13,3	1	12
261	4,00	4,30	85,0	69,0	21,2	16,0	1	15
2° Injection de 30 mgr de foie (préparation n° 67 — fraction B).								
264	5,34	4,74	101,0	95,0	18,9	20,1	2	2
265	5,10	4,92	96,5	96,0	18,9	19,5	1	0
3° Injection de 40 mgr. de foie (préparation n° 67 — fraction B).								
266	5,54	5,76	119,0	92,0	21,5	16,0	0,5	10
267	4,62	5,24	106,0	86,5	23,0	16,5	1	15
4° Injection de 50 mgr. de foie (préparation n° 67 — fraction B).								
268	5,14	6,04	109,0	90,5	21,2	14,9	2	18
269	4,19	5,18	115,0	97,0	27,4	18,7	0,5	15
5° Injection de 1 unité-Rat (extrait hépatique américain).								
276	4,68	4,92	94,0	82,0	20,4	16,7	1	31
278	4,52	4,90	96,0	87,0	21,4	17,6	0,5	12

(*) Immédiatement avant, et cinq jours après l'injection.

De l'examen du tableau n° VII, il ressort que l'injection de ces extraits hépatiques déjà plu. purifiés, aux doses correspondant à 500 mg. de foie frais (préparation n° 19), 50 et 40 mg. (préparation n° 67) est suivie des réactions hématologiques A, B et C. Celles-ci sont nettes et comparables à celles obtenues par l'injection d'extrait hépatique américain à la dose de 1 unité-rat. Quant à l'injection de la dose correspondant à 30 mg. de foie frais (préparation n° 67), nous voyons comme précédemment qu'elle ne provoque aucune réaction hématologique.

Ces résultats nous montrent déjà que la pureté des extraits hépatiques n'influe pas sur la qualité des réponses hématologiques ; ils nous montrent également que, grâce à notre test, il est possible de suivre facilement la conservation de l'activité des extraits hépatiques au cours des étapes successives de leur purification. En particulier, la précipitation par l'alcool (70°) permet de conserver intégralement l'activité anti-anémique dans le filtrat.

3° Etude de la fraction C.

Cette fraction est soluble dans l'alcool butylique. Pour la préparer, nous avons évaporé à sec un extrait correspondant à la fraction B. Nous avons réduit en poudre le produit obtenu et, après l'avoir mélangé à deux parties de sable ciliceux lavé, nous l'avons extrait sous pression réduite par de l'alcool butylique normal pendant une durée de 12 heures. Nous avons ensuite chassé complètement l'alcool butylique, repris le résidu par l'eau et filtré la solution obtenue.

Cet extrait correspond à la fraction L de COHN. Il est déjà très purifié ; il ne contient plus que 19 à 20 mg. d'azote pour une quantité d'extrait correspondant à 10 g. de foie frais. Nous avons pu constater, par chromatographie sur papier de cet extrait, qu'il ne contient plus que des acides aminés mono-amminés - monocarboxyliques (tryptophane, glyco-colle, alanine, valine, leucine, proline...) ; ce fait n'a d'ailleurs rien d'étonnant car seuls ces acides aminés sont solubles dans l'alcool butylique. La préparation de cette fraction C correspond vraisemblablement à celle des extraits hépatiques injectables d'origine américaine que nous avons utilisés : en effet, nous avons pu constater, par chromatographie sur papier, que ces derniers ne conte-

naient également que les acides aminés mono-aminés mono-carboxyiques.

Nous avons, suivant cette technique, préparé plusieurs échantillons d'extraits hépatiques que nous avons injectés aux rats aux doses suivantes :

Préparation n° 42 : injection d'une dose correspondant à 500 mg. de foie frais.

Préparation n° 67 : injection de doses croissantes d'extrait correspondant respectivement à 30, 40, 50 mg. de foie frais.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de cette expérience sont rassemblés dans le tableau n° IX.

TABLEAU N° IX. — *Modifications sanguines consécutives à l'injection, à des doses variables, de la fraction C, ou à l'injection de 1 unité-Rat d'extrait hépatique américain à des rats anémiés par manition protéique prolongée.*

RAT n°	Hématies p. mm ³ (N)		Hémoglobine p. mm ³ (H)		Valeur Globulaire (H/N)		Réticulocytes (R)	
	avant (°)	après (°)	avant	après	avant	après	avant	après
					1° Injection de 500 mgr. de foie (préparation n° 42 — fraction C).			
281	5,00	5,20	112,0	85,0	22,4	16,3	1,0	10
282	4,64	4,72	115,0	80,0	24,8	17,0	0,5	28
					2° Injection de 30 mgr. de foie (préparation n° 67 — fraction C).			
285	5,72	5,20	135,0	124,0	23,2	23,8	2	1
286	5,24	4,50	121,0	107,0	23,1	23,8	3	2
					3° Injection de 40 mgr. de foie (préparation n° 67 — fraction C).			
287	5,80	7,00	133,0	90,0	22,8	12,9	1	20
288	6,04	7,22	138,0	102,0	21,2	14,1	2	20
					4° Injection de 50 mgr. de foie (préparation n° 67 — fraction C).			
289	4,24	5,22	88,0	66,0	20,8	12,6	2	31
	4,80	5,68	100,0	74,0	20,8	14,2	1	20
					5° Injection de 1 unité-Rat (extrait hépatique américain).			
298	5,30	6,32	130,0	103,0	24,5	16,3	0,5	22
299	5,30	5,80	115,0	91,0	21,7	15,7	1	17

(*) Immédiatement avant, et cinq jours après l'injection.

De l'examen du tableau n° IX, il ressort que nous avons observé une réponse hématologique positive à la suite de l'injection d'extrait hépatique (Fraction C) aux doses correspondant à 500 mg. (préparation n° 42), 50 et 40 mg. de foie frais (préparation n° 67). La dose correspondant à 30 mg. de foie frais (préparation n° 67) s'est encore révélée incapable de provoquer une réponse hématologique satisfaisante.

Ces extraits (fraction C), à condition d'être injectés à des doses convenables, donnent donc des réactions hématologiques en tous points comparables à celles observées à la suite de l'injection des extraits hépatiques américains. Nous pouvons également noter que les résultats obtenus avec la préparation n° 67 nous montrent une conservation de l'activité de ces extraits à travers les étapes de leur purification, y compris l'extraction par l'alcool butylique n.

4° Etude de la fraction D.

Pour la préparation d'extraits hépatiques hautement purifiés, certains auteurs utilisent la précipitation par le phosphotungstate (COHN) ou par le sel de REINECKE (DAKIN). Nous avons préféré, pour notre travail, faire appel à l'action précipitante du sel de ROUSSIN ou nitrososulfure de fer (59). Nous avons procédé de la façon suivante : à 200 cm³ d'extrait hépatique purifié (fraction C) correspondant à 10 kg. de foie, nous avons ajouté un excès de solution aqueuse de sel de ROUSSIN, jusqu'à ce que les eaux-mères prennent la couleur vert olive de ce réactif. Nous avons abandonné le tout une nuit à la glacière. Nous avons isolé le précipité sur buchner. Nous avons régénéré la base en agitant le précipité avec de l'eau de baryte et avec de l'éther sulfurique. Le roussinate de baryum passe quantitativement dans l'éther tandis que les constituants organiques azotés se dissolvent dans la couche aqueuse. Nous avons éliminé la baryte en excès dans la couche aqueuse par l'acide sulfurique.

L'extrait ainsi obtenu est pratiquement incolore. Il contient de faibles quantités d'azote difficilement dosables par la méthode de KJELDAHL. Comme on pourrait s'y attendre, il ne renferme plus d'acides aminés car le sel de ROUSSIN ne précipite pas les seuls acides aminés mono-amminés mono-carboxyliques que contenait la fraction C. Nous avons vérifié ce fait par la réaction à la ninhydrine

qui s'est révélée négative et par chromatographie sur papier. En outre, cet extrait, en solution aqueuse, ne possède aucun spectre caractéristique.

Nous avons injecté aux rats des extraits préparés de cette façon aux différentes doses suivantes :

Préparation n° 17 : injection d'une dose d'extrait correspondant à 500 mg. de foie frais.

Préparation n° 67 : injection de doses croissantes d'extrait correspondant respectivement à 30, 40, 50 mg. de foie frais.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de cette expérience sont rassemblés dans le tableau n° X.

TABLEAU N° X. — *Modifications sanguines consécutives à l'injection, à des doses variables, de la fraction D, ou à l'injection de 1 unité-Rat d'extrait hépatique américain à des rats anémies par inanition protéique prolongée.*

RAT n°	Hématies p. mm ³ (N) n x 10 ⁶		Hémoglobine p. mm ³ (H) μ gr.		Valeur Globulaire (H/N) μ gr.		Réticulocytes (R) p. 100 hématies	
	avant	après (°)	avant	après	avant	après	avant	après
1° Injection de 500 mgr. de foie (préparation n° 17 — fraction D).								
305	4,68	4,94	100,0	79,0	23,5	16,0	1	25
307	4,92	5,04	108,0	89,0	22,0	17,6	1	15
2° Injection de 30 mgr. de foie (préparation n° 67 — fraction D).								
312	5,45	5,30	123,0	118,0	22,6	22,3	1	0,5
313	6,11	5,24	134,0	120,0	22,0	22,9	2	2
3° Injection de 40 mgr. de foie (préparation n° 67 — fraction D).								
314	4,79	5,22	110,0	83,0	23,0	15,9	2	10
315	5,98	6,44	130,0	100,0	21,7	15,5	1	15
4° Injection de 50 mgr. de foie (préparation n° 67 — fraction D).								
316	5,25	5,45	111,0	81,0	21,2	14,9	2	20
317	5,88	6,44	126,0	100,0	21,4	15,6	2	25
5° Injection de 1 unité-Rat (extrait hépatique américain).								
318	5,32	5,88	120,0	84,5	22,5	14,3	2	10
319	5,22	5,95	111,0	95,0	21,2	16,0	1	15

(*) Immédiatement avant, et cinq jours après l'injection.

Il ressort de l'examen du tableau n° X que cet extrait hépatique hautement purifié (fraction D) s'est révélé actif chez le rat aux doses correspondant à 500 mg. (préparation n° 17), 50 et 40 mg. de foie frais (préparation n° 67).

Les réactions hématologiques observées sont qualitativement comparables à celles obtenues par l'injection de 1 unité-rat d'extrait hépatique américain. La dose correspondant à 30 mg. de foie frais (préparation n° 67) s'est révélée incapable de provoquer une réponse hématologique satisfaisante.

La précipitation par le sel de ROSSIN entraîne donc quantitativement les substances responsables de l'activité hématopoïétique.

Enfin, nous avons contrôlé l'activité antipernicieuse de l'extrait ainsi préparé (fraction D) chez un malade atteint d'anémie de BIERMER et reconnu comme tel par le Service de Clinique médicale (Hôpitaux de Marseille - Professeur J. OLMER).

Avant le début des injections, l'examen hématologique pour ce malade vierge de tout traitement est le suivant :

- globules rouges p. mm³ de sang : 1.670.000.
- hémoglobine p. mm³ : 74 µg.
- valeur globulaire absolue µ µg. : 44,2.
- valeur globulaire relative : 1,47.
- réticulocytes p. 100 hématies : 0,5.

Le malade reçoit donc chaque jour une injection de cet extrait (notre fraction D) correspondant à 50 g. de foie frais.

Le cinquième jour après le début du traitement, l'examen de laboratoire donnait :

- globules rouges p. mm³ : 2.480.000.
- hémoglobine p. mm³ : 76 µg.
- valeur globulaire absolue µ µg. : 30,8.
- valeur globulaire relative : 1,00.
- réticulocytes p. 100 hématies : 20.

Après 25 jours de traitement par cet extrait hépatique, on note :

- globules rouges p. mm³ de sang : 3.800.000.
- hémoglobine p. mm³ : 121 µg.
- valeur globulaire absolue µ µg. : 32,0.
- valeur globulaire relative : 1,07.
- réticulocytes p. 100 hématies : 4.

A partir de ce jour, ce malade ne reçoit plus qu'une injection de l'extrait hépatique (fraction D - préparation n° 16) à la dose correspondant à 50 g. de foie frais tous les deux jours.

Les examens de laboratoire rapportent, après deux mois de ce traitement, les résultats suivants :

- globules rouges p. mm³ de sang : 4.360.000.
- hémoglobine p. mm³ : 133 µg.
- valeur globulaire absolue µ µg. : 30,5.
- valeur globulaire relative : 1,00.
- réticulocytes : 0,5 p. 100 hématies.

De l'examen de ces résultats cliniques, il ressort que chez ce malade atteint d'anémie pernicieuse on observe déjà, après les premiers jours de traitement avec l'extrait hépatique (fraction D), une augmentation du nombre des hématies, de l'hémoglobine et une forte crise réticulocytaire ; la valeur globulaire, initialement très élevée, est maintenant au voisinage de sa valeur normale (30 µ µg.). Après deux mois de traitement, le tableau hématologique du malade est devenu pratiquement normal. Nous avons donc obtenu ainsi la certitude de l'activité antipernicieuse de l'extrait de foie préparé suivant la technique que nous venons d'étudier.

Discussion des résultats. — L'étude des résultats que nous avons acquis au cours de cette série d'expériences nous permet de faire les constatations suivantes : comme nous avons déjà pu le constater au cours des recherches sur la spécificité de notre test, le rat anémié par inanition protéique prolongée, est un réactif de choix du facteur hépatique antipernicieux : grâce à ce test, nous avons pu suivre pas à pas les différentes étapes de la purification des extraits de foie ; quelle que soit en effet la pureté des extraits mis en œuvre, les réactions hématologiques ont toujours été observées avec une grande netteté. La présence en grande quantité d'impureté, au début de la purification, ne diminue donc en rien la qualité des réactions hématologiques provoquées par l'injection d'un extrait hépatique actif.

A l'aide de ce test, nous avons également pu suivre quantitativement la conservation de l'activité des extraits de foie au cours des différentes opérations chimiques que comporte leur purification. Pour la préparation n° 67,

nous avons pu voir que la fraction A contenait une unité-rat pour une quantité d'extrait équivalente à 10 mg. de foie. Les fractions B, C et D de cette même préparation accusent une activité identique, et, si l'on admet la correspondance 1 unité U.S.P. = 500 unités-rats, on peut en conclure que les fractions A, B, C, D apportent 1 unité clinique U.S.P. pour une quantité d'extrait équivalente à 20 g. de foie frais. Grâce à notre test, nous avons donc pu éliminer de nombreuses impuretés, tout en conservant l'activité initiale.

Tous ces résultats sont à nouveau de nature à confirmer le degré élevé de spécificité de notre test, spécificité que nous avons établie précédemment. Ils nous montrent que les réactions hématologiques provoquées chez le rat par l'injection d'un extrait de foie actif ne peuvent être imputées aux impuretés contenues dans celui-ci.

Enfin, nous avons vu que la fraction D des extraits hépatiques que nous avons été amené à préparer pour les besoins de notre travail est incolore et ne possède aucun spectre caractéristique. On peut donc en déduire que cette fraction ne contient pas de vitamine B₁₂ ; cependant elle s'est révélée active aussi bien dans l'anémie pernicieuse humaine que dans l'anémie expérimentale du rat par inanition protéique. De tels faits nous permettent donc de conclure que la vitamine B₁₂ ne peut être identifiée au principe hépatique antipernicieux.

II. — SUR LA NATURE DU FACTEUR HEPATIQUE ANTIPERNICIEUX

Le facteur hépatique antipernicieux est-il de nature vitaminique ou hormonale ?

La maladie de BIERMER est attribuée à l'impuissance où se trouve le malade d'élaborer ou d'utiliser un facteur indispensable à une hématopoïèse normale.

Pour certains auteurs, ce facteur serait une hormone sécrétée soit par le foie, soit par l'estomac, et accumulée dans le foie (141 *bis*).

Mais on tend actuellement à admettre que l'anémie pernicieuse aurait pour origine un défaut d'assimilation ou de résorption d'une vitamine au cours du tractus digestif. Nous avons vu que plusieurs vitamines du groupe B étaient efficaces dans le traitement d'anémies secondaires, mais que seuls, à des doses élevées, l'acide folique, et surtout la vitamine B₁₂ étaient doués d'activité antipernicieuse ; en effet, la découverte de la vitamine B₁₂ a remis à l'ordre du jour l'ancienne théorie de CASTLE (35). De nombreux auteurs l'identifient au facteur hépatique antipernicieux ; ils estiment, avec CASTLE, que la maladie de BIERMER est due à une carence en vitamine B₁₂ qui, faute du facteur intrinsèque, ne franchit pas la paroi digestive. Cette vitamine est apportée par l'alimentation. Elle peut être fournie en partie par une synthèse réalisée par les bactéries intestinales.

Ces derniers faits paraissent relativement simples et satisfont l'esprit car la découverte de la vitamine B₁₂ a incontestablement apporté un élément du plus haut intérêt. Mais ils ne suffisent pas à tout expliquer de l'anémie pernicieuse.

Cette tendance actuelle est basée sur l'identification de la vitamine B₁₂ au principe antipernicieux lui-même. Or, comme nous venons de le voir, nous avons préparé des

extraits hépatiques actifs quoique dépourvus de vitamine B₁₂. Nous avons démontré la présence dans le foie de substances actives dans l'hématopoïèse et d'une nature différente de celle de la vitamine B₁₂. Nous sommes, en cela, en accord avec EMERY et PARKER (67) qui ont montré que des extraits hépatiques purifiés et actifs ne possédaient pas de spectre caractéristique.

Ces résultats nous amènent donc à discuter de la nature vitaminique ou hormonale de ces substances présentes dans le foie et différentes de la vitamine B₁₂. En ce qui nous concerne, nous avons essayé d'étudier les modifications que peut entraîner chez le rat l'administration d'un régime carencé en substances hématopoïétiques.

Nous avons, en effet, pensé que si ces substances étaient apportées par l'alimentation, c'est-à-dire s'il s'agissait de vitamines, elles pourraient s'accumuler dans le foie ; de telles réserves hépatiques pourraient être épuisées par une longue période d'un régime sévèrement carencé en vitamines hématopoïétiques. Si par ailleurs le régime est dépourvu d'azote, on se place dans les conditions favorables à l'apparition de l'anémie que nous avons étudiée et l'on diminue les possibilités de la biosynthèse du facteur hématopoïétique par les bactéries intestinales. Si tel était le cas, nous aurions prouvé la nature vitaminique de ces facteurs antipernicieux. Si au contraire, dans les mêmes conditions, le foie des animaux possède encore une activité hématopoïétique, les substances responsables de cette activité auront été soit élaborées par le foie, et on aurait alors affaire à une hormone, soit apportées par une synthèse réalisée par les bactéries intestinales. Dans ce dernier cas, les substances synthétisées auraient pu être accumulées dans le foie après avoir franchi la paroi digestive ; en effet, un défaut de résorption intestinale n'a pas, a priori, de raison de se produire chez le rat anémié par inanition protéique.

Dans le but de répondre à ces diverses questions, nous avons sacrifié des rats maintenus à un régime synthétique privé de protides et de vitamines hématopoïétiques du groupe B (acide folique, vitamine B₁₂). Avec leur foie, nous avons préparé des extraits correspondant à notre fraction B. Nous avons injecté chacun des extraits ainsi obtenus à une dose unique correspondant à 0,5 g. de foie frais et testé leur activité suivant notre technique. Nous sommes ainsi à

l'abri des réactions que pourrait provoquer la présence de vitamine B₁₂ dans de tels extraits hépatiques : une dose correspondant à 0,5 g. de foie frais ne saurait en aucun cas contenir 1 µg. de vitamine B₁₂, quantité minimum nécessaire, comme nous l'avons établi, pour obtenir une réponse hématologique positive, d'autant plus que FROST (80) a montré que la teneur du foie en vitamine B₁₂ était sensiblement diminuée quand les rats étaient maintenus pendant 6 semaines à un régime pareillement carencé.

Le tableau ci-dessous contient les résultats d'expériences faites à partir d'extraits préparés avec les foies d'animaux sacrifiés au bout des temps suivants d'inanition protéique : 0 jour (témoins), 15, 27 et 40 jours. Nous avons rapporté les données relatives aux examens de sang effectués immédiatement avant l'injection et 5 jours après.

TABLEAU N° XI. — Réactions hématologiques provoquées, chez le rat anémié par inanition protéique prolongée, par l'injection d'extraits (0,5 g. d'organe frais) préparés avec les foies d'animaux sacrifiés au bout d'un temps variable d'inanition azotée.

RAT n°	jours d'inanition de l'animal donneur d'extrait hépatique	Hématies p. mm ³ (N)		Hémoglobine p. mm ³ (H)		Valeur Globulaire (H/N)		Réticulocytes (R)	
		avant	après*	avant	après	avant	après	avant	après
330	0 jour	3,75	4,60	66,0	56,0	17,6	12,2	2	35
331	15 jours	5,20	5,45	95,0	72,0	18,2	13,2	2	30
332	15 jours	4,20	4,10	81,5	57,0	19,4	13,9	2	40
333	27 jours	4,38	5,11	73,5	58,5	16,7	11,4	1,5	35
334	40 jours	5,84	6,05	116,0	67,5	19,9	11,2	1	45
335	40 jours	4,12	5,27	71,0	57,0	17,2	10,8	2	25

(*) Immédiatement avant, et cinq jours après l'injection.

De l'examen du tableau n° XI il ressort que, quelle que soit la durée de l'inanition protéique, le foie des animaux sacrifiés présente toujours dans la dose équivalente à 0,5 g. de foie frais une quantité de substance suffisante pour déclencher les réactions sanguines caractéristiques d'une nette activité hématopoïétique (réactions A, B et C).

Discussion des résultats. — Nous avons déjà vu que les réactions hématologiques observées ne peuvent pas être dues à la présence de vitamine B₁₂ dans les extraits de foie. La dose injectée ne peut contenir une quantité suffisante de cette vitamine pour déclencher de telles réactions.

On pourrait conclure que l'inanition protéique, même poussée à l'extrême, a été incapable d'épuiser complètement le foie des animaux de ses réserves en un facteur d'origine alimentaire ; mais il faudrait alors penser que ces réserves hépatiques sont inépuisables.

On peut également supposer que ce facteur aurait été synthétisé par les bactéries intestinales car la paroi digestive des rats est intacte et ne peut s'opposer au passage de cette substance et à son accumulation dans le foie.

Il est à notre sens plus logique de penser que les substances, actives dans l'hématopoïèse, dont nous venons de démontrer la présence dans le foie des animaux carencés ont bien été élaborées par cet organe. Ceci est en accord avec le fait que les extraits préparés à partir de foie de biermérien ne présentent aucune activité hématopoïétique alors que ces foies contiennent encore de faibles quantités de vitamine B₁₂ (61 bis).

En résumé, ces observations nous permettent de conclure que le facteur hépatique antipernicieux est de nature hormone ou bien qu'il provient d'une synthèse réalisée par les bactéries intestinales, mais ce facteur ne peut, en aucun cas, être apporté par l'alimentation.

CONCLUSIONS

Les recherches de pathologie expérimentale que nous avons poursuivies sur l'anémie provoquée chez le rat blanc par inanition protéique, nous ont conduit à préciser les caractères de cette anémie par carence, laquelle a pu servir de base à un test biologique de l'activité des extraits hépatiques.

L'inanition protéique permet d'obtenir une anémie présentant les caractères suivants : au bout de 30 à 35 jours du régime dépourvu de protides, les animaux subissent une perte azotée considérable. Ainsi que l'ont montré A. et J. ROCHE, cette perte azotée ne peut être réparée que dans des conditions tout à fait particulières si bien que, en général, on peut la considérer comme irréversible. L'examen du sang de ces animaux inanitiés montre la gravité de l'anémie dont ils sont atteints. Le nombre des hématies ne représente plus que 50 p. 100 de la valeur normale. Ces hématies sont riches en hémoglobine ; l'anémie est nettement de caractère hyperchrome. Par cela cette anémie se rapproche de l'anémie de BIERMER (diminution considérable du nombre des hématies ; valeur globulaire très élevée). Cependant on ne peut identifier pour autant l'anémie par inanition protéique à l'anémie de BIERMER. Mais est-il vraiment donné souvent de réaliser chez l'animal pour la traiter une affection identique à celle qu'on observe chez l'homme malade ? L'anémie expérimentale que nous avons étudiée n'en présente pas moins l'avantage, sur les autres anémies par carence d'être une anémie hyperchrome obtenue dans des délais relativement courts. D'autre part, elle a été réalisée d'une manière physiologique en privant l'animal des métabolites nécessaires à l'édification des érythrocytes et en s'opposant ainsi au renouvellement des globules rouges.

Les rats anémiés par inanition protéique réagissent à une injection unique d'extrait hépatique, reconnu par ailleurs actif dans l'anémie pernicieuse humaine, de la façon suivante : la chute du nombre des globules rouges paraît nettement freinée dans les premiers jours qui suivent l'injection (réaction A) mais, étant donné que les animaux demeurent soumis au régime sans azote, on n'observe aucune régénération globulaire. Au contraire, par la suite, le nombre des hématies diminue avec une vitesse accélérée et tout se passe comme si l'excitation de l'hématopoïèse sous l'effet du médicament avait complète-

ment épuisé les réserves de l'animal. Cependant, les réactions les plus nettes observées à la suite de cette injection unique d'extrait hépatique résident dans une importante chute de la valeur globulaire (réaction B), chute qui atteint son maximum d'intensité le 5^e jour après ce traitement. Ce minimum de la valeur globulaire coïncide avec le maximum d'une forte crise réticulocytaire (réaction C).

Au cours de nos expériences, nous avons essayé de mettre à profit ces observations pour réaliser non seulement un essai qualitatif mais encore un dosage du principe antipernicieux. Pour cela, nous avons cherché la valeur de la dose minima d'extrait hépatique permettant d'obtenir une chute nette de la valeur globulaire (réaction B) simultanément à l'apparition d'une forte crise réticulocytaire (réaction C). Nos expériences nous ont montré que ce but était atteint pour une dose équivalente à 1/500^e d'unité clinique (U.S.P.). On peut donc proposer de définir une unité-rat (U.R.) sur les bases précisées ci-dessus et établir que l'unité clinique (U.S.P.) équivaut à environ 500 de nos unités-rats.

Ces observations nous ont permis de proposer un test biologique, à la fois qualitatif et quantitatif, de l'activité des extraits de foie.

L'action des substances responsables des réactions hémalogiques A, B et C paraît devoir s'exercer spécifiquement sur les phénomènes de reproduction des hématies et non pas sur ceux relatifs à la synthèse de l'hémoglobine ; en effet, il est vraisemblable que l'animal inanitié ne dispose plus d'un matériel azoté suffisant pour former des quantités importantes de ce pigment. Par contre, sous l'effet de l'excitation provoquée par une injection d'extrait hépatique actif, les organes hématopoïétiques demeurent capables d'engendrer de nouveaux hémotoblastes dont la transformation en jeunes hématies résulte de leur pénétration par l'hémoglobine récupérée lors de la destruction des vieux érythrocytes. Si tel est le cas, ces recherches contribuent déjà à établir la spécificité du test dont nous avons posé le principe, vis-à-vis du facteur antipernicieux du foie. Cependant l'anémie expérimentale par inanition protéique n'est pas une anémie pernicieuse de BIERMER. Il nous a donc été nécessaire de préciser les limites de la spécificité de ce test. Nous avons vu que différentes substances

peuvent jouer des rôles divers au cours de l'hématopoïèse et être de ce fait considérées comme anti-anémiques, sans efficacité toutefois vis-à-vis de l'anémie pernicieuse. Seuls, dans l'état actuel des connaissances, les extraits hépatiques et la vitamine B_{12} sont doués d'une activité spécifiquement antipernicieuse. Nous avons montré qu'à l'exclusion de toute autre substance, seuls, ces derniers, injectés à des doses convenables, sont capables de provoquer les réactions hématologiques A, B et C dont l'observation est à la base du test proposé. Nous avons, de ce fait, démontré le degré élevé de spécificité du test que nous proposons, vis-à-vis d'un facteur antipernicieux.

Cependant, l'injection de faible quantité d'extrait hépatique a été suffisante pour obtenir nettement les réactions A, B et C, alors qu'il nous a fallu faire appel à des doses extrêmement élevées de vitamine B_{12} pour observer des réactions comparables. De tels faits nous ont fait penser qu'il fallait rechercher ailleurs que dans la seule présence de la vitamine B_{12} l'origine de l'activité antipernicieuse des extraits de foie.

La seconde partie de nos recherches a été consacrée à la mise au point du contrôle biologique de la purification des extraits de foie.

Les résultats obtenus nous ont montré que la présence des impuretés qui se trouvent dans les extraits de foie à côté du facteur antipernicieux ne gênent en rien la netteté des réactions hématologiques que provoque ce dernier chez le rat anémié par inanition protéique. Nous avons également constaté que le test que nous proposons est un moyen de contrôle sûr, permettant de suivre tant qualitativement que quantitativement, la conservation de l'activité antipernicieuse des extraits hépatiques à travers les opérations chimiques nécessaires à leur purification.

Enfin, pour les besoins de ce travail, nous avons été amené à préparer, suivant les techniques classiques, des extraits hépatiques de plus en plus purifiés. Nous avons obtenu une fraction D, hautement purifiée, pratiquement incolore et ne possédant aucun spectre caractéristique. Ces observations nous ont permis de conclure à l'absence de vitamine B_{12} dans cet extrait. Celui-ci, cependant, s'est révélé nettement actif non seulement dans l'anémie expérimentale du rat, mais aussi dans l'anémie pernicieuse humaine. Nous pensons donc pouvoir conclure, comme

nous l'avions déjà pressenti, qu'il existe dans les extraits de foie, à côté de la vitamine B₁₂, d'autres facteurs doués d'une activité antipernicieuse et d'une nature différente de celle de la vitamine B₁₂. Ces facteurs sont, à notre sens, soit élaborés par le foie, soit apportés par une synthèse réalisée par les bactéries intestinales et accumulés dans cet organe ; en effet, nous avons mis en évidence leur présence dans le foie d'animaux soumis depuis 40 jours à un régime synthétique sévèrement carencé en protides et en vitamines hématopoïétiques du groupe B (vitamine B₁₂, acide folique), ce qui nous a permis d'éliminer une origine alimentaire de ces facteurs. Nous avons à nouveau démontré au cours de cette expérience que la substance élaborée par le foie ou synthétisée par les bactéries intestinales ne pouvait être en aucun cas la vitamine B₁₂.

En résumé, ce travail nous a permis de mettre au point un test biologique de l'activité antipernicieuse des extraits hépatiques et aussi spécifique que possible de cette activité. Ce test est basé sur l'observation des réactions hématologiques du rat anémié par inanition protéiques prolongée. Nous pensons qu'un tel test sera utile non seulement à ceux qui seront tentés de chercher à isoler et à identifier le ou les principes antipernicieux présents dans le foie mais aussi au contrôle de l'activité des médicaments antipernicieux et principalement des extraits hépatiques.

Vu, le Président du Jury :
Professeur C. DUMAZERT.

Vu et Approuvé,
Le Doyen : G. MORIN

Vu et Permis d'Imprimer,
Aix. le 24 novembre 1953.
Le Recteur: GAU.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALEKSANDROWICZ J. und GABRYELSKI W. *Folia Haematol.*, 1937, 57, 337.
2. ANGIER et al. — *Sciences (N. Y.)*, 1946, 103, 667.
3. ARTHUS A., LOURAU M. et de SACY S. — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 117, 861.
Ibid, 1935, 120, 583. — *Ibid*, 1938, 128. — *Ibid*, 1939, 130, 642. —
Sang, 1935, 9, 226-242. — *Presse méd.* 1937, 1102-1105.
4. ASCHKENASY A. — *Sang*, 1946, 17, 34.
5. ASCHKENASY A. — *Exp. Ann. Biochim. Med.*, 1949, 10, 309.
6. AXELROD A. et al. — *J. biol. Chem.*, 1943, 148, 721.
7. BACKMANNE GRAHS E., HULTGREEN G. and PRICE H. — In *Médicaments
antianémiques et Anémies expérimentales*, par J. CHEYMOL. Un vol.
102 p., Masson et C^{ie}, édit., 1940, voir p. 58.
8. BEARD H. et al. — *J. Biol. Chem.*, 1931, 94, 71-110 et 111-115 et 118
et 146. X
9. BEAVEN et al. — *J. Pharm. Pharmacol.*, 1950, 2, 944.
10. BENCE J. — *Wien. Med. Wsch.*, 1933, 38, 1055-1058, et *Z. klin. Med.*,
1936, 130, 275-309.
11. BENDA R., THOYER-ROZAT P. et URQUIN D. — *Sang*, 1937, 11, 885-890,
ibid., 12, 765-773.
12. BERK L., DENNY, BROWN, FINLAND M., CASTLE W. — *New Eng. J. Med.*,
1948, 239, 328.
13. BERK L., CASTLE W., WELCH A., HEINIE R., ANKER R., EPSTEIN M. —
New Eng. J. Med., 1948, 239, 911.
14. BETHELL, LARDY. — *J. Nutr.*, 1949, 37, 495.
15. BINKLEY S. et al. — *Science (N.-Y.)*, 1944, 100, 36.
16. BIRD et al. — *J. Biol. Chem.*, 1945, 157, 413 et 159, 631 et 1946, 163, 649.
17. BLOOM E. et al. — *Science (N.-Y.)*, 1944, 100, 295.
18. BOMSKOV C. et al. — *Z. ges. exper. Med.*, 1933, 89, 786-825.
19. BOXER, RICARDS. — *Arch. of Biochem.* 1950, 29, 75-84.
20. BRICKMANN R. und SZENT-GYORGYL. — *Verlasgen D. afdelling Natuur-
kunde*, 1922, 32-483 et *Ber. Physiol.*, 1923, 21, 475.
21. BRIGGS G. et al. — *J. Biol. Chem.*, 1943, 148, 163.
22. BRIGGS G., LUCKEY T., ELVEHJEM C. and HART E. — *J. Biol. Chem.*,
1945, 158, 303.
23. BRINK N. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, 72, 1866.
24. BRINK N., KNEHL F., FOLKERS K. — *J. Amer. Chem Soc.*, 1949, 71,
2951.
25. BRINK N., KNEHL F., FOLKERS K. — *Science*, 1950, 112, 354.
26. BUCHANAN J. — *J. Amer. Med.*, 1929, 35, 673.
27. BUCHANAN J. — *Chem. and Ind.*, 1950, 426.
28. BUNTING C.-H. — *J. Exper. Med.*, 1906, 8, 625-646 et *ibid.*, 1906, 11,
544-552.
29. CAMPBELL C., BROWN R. and EMMETT R. — *J. Nutrit.* (sous presse).
30. CAMPBELL C., BROWN R. and EMMETT A. — *J. Biol. Chem.*, 1944, 154,
721.
31. CASHWELL et al. — *J. Biol. Chem.*, 1949, 180, 125.

32. CASTLE W., TOWNSEND W. and HEATH C. — *Amer. J. Med. Sc.*, 1930, 180, 305-335.
33. CASTLE W. — *Amer. J. Med. Sc.*, 1929, 178, 748-763.
34. CASTLE W. et al. — *Science* (N.-Y.), 1944, 100, 81-83.
35. CASTLE W. — *Ann. Int. Méd.*, 1951, 34, 1093-1106.
36. CHARGAFF. — *Experientia*, 1950, 6, 229-231.
37. CHEVALLIER P. — *L'Anémie*, 1 vol., 160 p., édit. Exp. Sc. Franç., Paris, 1946.
38. COHN E.-J. et al. — *J. Biol. Chem.*, 1928, 77, 325.
39. COHN E.-J., Mc MEEKIN T. and MINOT G. — *Trans. Amer. Physicians*, 1930, 45, 343.
40. *Congrès International d'Hématologie*, Lamet, 1905, 407.
41. COOLEY et al. — *J. Pharm. Pharmacol.*, 1950, 2, 535.
42. COOPERMAN J. et al. — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1946, 61, 92.
43. *Council on Pharmacy and Chemistry*. — *J. Amer. Med.*, 1935, 105, 1269.
44. CRESKOFF A. and FITZ HUGH. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1939, 24, 411-415.
45. CROWFOOD, BRINK N. et al. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1949, 71, 1854-1856.
46. CUTHBERTSON D. — *Brit. Med. Bull.*, 1944, 2, 207-217.
47. CUTHBERTSON D., FLEMING J. and STEVENSON E. — *Glasgow Med. J.*, 1931, 116, 201.
48. DAFT F. and SEBRELL W. — *U.S. Publ. Health Service, Publ. Health Rept.*, 1943, 58, 1542.
49. DAKIN H., UNGLEY C. and WEST R. — *J. Biol. Chem.*, 1936, 115, 771.
50. DAKIN H. and WEST R. — *J. Biol. Chem.*, 1935, 109, 489.
51. DARBY W., JONES E. — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1945, 60, 259.
52. DAVISON C. — *Arch. Intern. Med.*, 1941, 67, 473.
53. DAVIDSON L.-S. — *Sang*, 1929, 3, 277-303.
54. DAY P. et al. — *J. Biol. Chem.*, 1945, 157, 423.
55. DAY P., LANGSTON W. and DARBY W. — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1938, 38, 860.
56. DAY P. et al. — *J. Exp. Med.*, 1940, 72, 463.
57. DAY P., LANGSTON W. and SCHUKERS C. — *J. Nutrit.*, 1935, 9, 637.
58. DIEHL, VAN DER HAAR, SEALOCK. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, 72, 2615.
59. DOBRY A. — *Trav. Memb. Soc. Chim. Biol.*, 1941, 23, 1438.
60. DOBRINER K. and RHOADS C. — *J. Clin. Investig.*, 1938, 17, 95.
61. DOMINICI G. et PENATI E. — *Minerva Med.*, 1931, 2, 413.
62. DUMAZERT C. et VERMEULEN M. — *C.R. Soc. Biol.*, 1947, 141, 292-294.
63. EISLER B., HAMMARSTEN E. und THEORELL H. — *Naturwissenschaften*, 1936, 24, 142.
64. ELLIS B., PETROW V., SNOOK G. — *J. Pharm. Pharmacol.*, 1941, 1, 60-61, 287-290.
65. ELLIS B. et al. — *J. Pharm. Pharmacol.*, 1949, 1, 950-956.
66. ELLMANN. — *J. Med. Pharm. Ass.*, 1946, 7, 13-20.
67. EMERY O. and PARKER O. — *Biochem. J.*, 1946, 40, IV (prol.).
68. ERDOS J. — *Biochem. Z.*, 1935, 277, 337-342 et 342-348.
69. ELVEHJEM C. et al. — *J. Biol. Chem.*, 1928, 77, 769, 795 ; 1931, 93, 189-201 ; 1933, 103, 61-70 ; 1933, 111, 357-371 et 617-628 ; 1936, 116, 93-106 ; 1938, 124, 419-424 et 26, 155-173.
70. FAUST E. und TALQUIST T. — *Arch. Exper. Path.*, 1907, 57, 370.
71. FAUST E. und SCHMINCKE A. — *Arch. Exper. Path.* (suppl.), 1908, 5, 171.
72. FIESSINGER N. et LAUR C. — *Sang*, 1932, 6, 316-322.
73. FELIX K. und FRUHWEN H. — *Z. Physiol. Chem.*, 1933, 216, 173.
74. FIRKET J. — *C. R. Soc. Biol.*, 1921, 85, 727.
75. FISKE C., SUBBAROW Y. and JACOBSON B. — *J. Clin. Investig.*, 1935, 14, 709.
76. FLEMING R. — *Biochem. J.*, 1932, 26, 461.
77. FOLKERS K. — 1^{re} Cong. Int. de Biochim., Cambridge, 1949.

78. FONTES G. et THIVOLLE L. — *C.R. Soc. Biol.*, 1925, 98, 687 ; 1932, 109, 911. — *Sang.*, 1930, 4, 658-730 ; 1932, 6, 691-695 ; 1933, 7, 209-255 et 341-353, et 455-478 ; 1934, 8, 520-565 et 741.767 ; 1936, 10, 144-177 et 1056-1087.
79. FOUTS P., HELMER O. and ZERFAS. — *Ann. Intern. Med.*, 1935, 8, 790.
80. FREST, FRICKER. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1949, 72, 102.
81. FRIEDEN E., MITCHELL H. and WILLIAMS R. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1944, 66, 629.
82. GESSLER C., DEXTER S., ADAMS M. and TAYLOR F. — *J. Clin. Invest.*, 1940, 19, 225.
83. GLASS G., BOYD L., RUBINSTEIN M., SVIGALS C. — *Science*, 1952, 115, 101-108.
84. GOTTFLEBE P. et al. — *Arch. Exper. Path. Pharmacol.*, 1936, 180, 354-366 et 229-234 ; 1936, 181, 317-324 ; 1936, 182, 91-97 ; 1937, 185, 353-358.
85. GREENE. — *J. Biol. Chem.*, 1949, 178, 999.
86. HAHN P., WIPPLE G. — *J. Exper. Med.*, 1939, 69, 315.
87. HANELU. — *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 1948, 78, 1101.
88. HAUSSMANN K. — *Klin. Wochenschr.*, 1948, 26, 504.
89. HAYS E. — *Amer. J. Med. Sci.*, 1948, 216, 528.
90. HEINLE R., WELCH A., GEORGE W., EPSTEIN M., PRITCHARD J. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1947, 32, 1398.
91. HENRY. — *Ann. Biol. Clin.*, 1945, 5, 101.
92. HILL F., NORRIS L., HEUSER G. — *J. Nutrit.*, 1944, 28, 175.
93. HOFF-JORGENSEN, SKAUBY, ANDRESEN. — *Brit. Med. J.*, 1953, 1, 927.
94. HOGAN A., PAROTT E. — *J. Biol. Chem.*, 1940, 132, 507.
95. HOLIDAY E., PETROW V. — *J. Pharm. Pharmacol.*, 1949, 1, 734.
96. HOPKINS F. — *Proc. Chem. Soc.*, 1889, 5, 117.
97. HOPPE-SEYLER. — *Z. Physiol. Chem.*, 1885, 9, 34-39.
98. HURST A. — *Lancet*, 1923, 1, 111-115.
99. HUTCHINGS B., BOHONOS N. and PETERSON W. — *J. Biol. Chem.*, 1941, 141, 521.
100. HUTCHINGS B. et al. — *J. Biol. Chem.*, 1941, 140, 681.
101. HUTNERS et al. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1949, 70, 118.
102. IRVING, SHEMAIND, WEST, RITTENBERG. — *J. Biol. Chem.*, 1949, 179, 463.
103. ISAAC S. und MOCKEL K. — *Z. Klin. Med.*, 1911, 72, 231-256.
104. JACOBS H. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1937, 22, 371 et 890 et 892, *ibid.*, 1938, 24, 128.
105. JACOBSON B. and SUBBAROW Y. — *J. Amer. Med. Assoc.*, 1941, 116, 367.
106. JACOBSON B. and SUBBAROW Y. — *J. Clin. Invest.*, 1937, 16, 573.
107. JASTROWITZ H. und NEIDHARDT K. — *Z. Exper. Med.*, 1931, 75, 526-542.
108. JONES N. et al. — *Ann. Internat. Med.*, 1929, 2, 603.
109. KACZKA, WOLF, FOLKERS K. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1949, 71, 1514.
110. KACZKA, WOLF, KNEHL. — *Science*, 1950, 112, 354.
111. KAMINER S. and ROHNSTEIN R. — *Berl. Klin. Wsch.*, 1900, 687-689.
112. KARRER P., FREI P. et FRITZCHE H. — *Helv. Chim. Acta.*, 1937, 20, 622.
113. KARRER P., FREI P. et RINGIER B. — *Helv. Chim. Acta.*, 1938, 21, 314.
114. KERESZTESY J., RICKES E. and STOKES J. — *Science (N.-Y.)*, 1943, 96, 528.
115. KLEIN L. and WILKINSO J. — *Biochem. J.*, 1934, 28, 1684 1933, 27, 600.
116. KLINE O., KEENAN J.-A., ELVEHJEM C. and HART. — *J. Biol. Chem.*, 1932, 99, 295.
117. KOLLER E. — *Dtsch. Archiv. Klin. Med.*, 1938, 183, 296.
118. KOSER F. — *Arch. Exper. Path.*, 1936, 180, 183.
119. KRUEGER K. and PETERSON W. — *J. Biol. Chem.*, 1945, 158, 145.
120. LALAND P., KLEM A. — *Acta Med. Scand.*, 1936, 88, 620.
121. LAMBIN P. et CORNIL B. — *C. R. Soc. Biol.*, 1931, 107, 264.
122. LANSTON W. et al. — *J. Exper. Med.*, 1938, 68, 823.
123. LASH F. — *Klin. Wsch.*, 1937, 16, 810.
124. LASKOWSKI M., MIMS V. and DAY P. — *J. Biol. Chem.*, 1945, 157, 731.
125. LATNER A., UNGLEY C. et al. — *Brit. Med. J.*, 1952, 1, 467-473.

126. LATNER A., UNGLEY C. et al. — *Ann. Biochem.*, 1952, 21, 633.
127. LENS, WINCKLER, WOLFF et al. — *Biochem. Biophys. Acta.* 1952 8, 56-65.
128. LOURAU M. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, 25, 393.
129. MAZZA F. et PENATI F. — *Arch. Sci. Biol. (Italie)*, 1937, 23, 443, et *ibid.*, 1938, 24, 83.
130. MESSERSCHMIDT M. — *Sang.*, 1948, 274.
131. MILLS R., BRIGGS G., ELVEHJEM C. and HART E. — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1942, 49, 186.
142. MIMS V. and LASKOWSKI M. — *J. Biol. Chem.*, 1945, 160, 493.
133. MIMS V., TOTTER J. and DAY P. — *J. Biol. Chem.*, 1944, 155, 401.
134. MINOT F. and MURPHY W. — *J. Amer. Med. Assoc.*, 1926, 87, 470 et 1927, 89, 759.
135. MINOT G., COHN E., MUROHY W. and LAWSON F. — *Amer. J. Med. Sci.*, 1928, 175, 599, 622.
136. MINOT G. — *Brit. Med. J.*, 1948, 11, 153.
137. MITCHELL H. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1944, 66, 276.
138. MITCHELL H., SNELL E. and WILLIAMS R. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1941, 63, 2284 et *Ibid.*, 1944, 66, 267.
139. MITCHELL H. and WILLIAMS R. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1944, 66, 271.
140. MITCHELL H. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1944, 66, 271.
140. MITCHELL H. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1944, 66, 274.
141. MOUTTE M. — Thèse Doct. Pharm., Marseille, 1941.
- 142 bis MORRIS L. et al. — *J. Amer. Med. Assoc.*, 1933, 100, 171-173.
142. MUIR, NEUBERGER. — *Biochem. J.*, 1949, 45, 163.
143. NORRIS E. and SIMMONS R. — *J. Biol. Chem.*, 1945, 158, 449.
144. O'DELL B. and HOGAN A. — *J. Biol. Chem.*, 1943, 149, 323 ; 1934, 13, 1538.
145. ORTENA, ORTEN J. — *J. Nutrit.*, 1943, 26, 21-31.
146. OLSON, BUNIS, ELVEHJEM C. — *J. Amer. Diet. Ass.*, 1947, 23, 200.
147. PASCHKIS K. and TAYLOR G. — *Klin. Wschr.*
148. PEABODY W. and NEALE R. — *J. Amer. Pharm. Assoc.*, 1933, 22, 1231.
149. PETROW V., GORDON. — *Res. Conf. Colby College.* août 1950.
150. PFIFFNER et al. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1946, 68, 1392.
151. PFIFFNER J. et al. — *Science (N.-Y.)*, 1945, 102, 228.
152. PFIFFNER J. et al. — *Science (N.-Y.)*, 1943, 97, 404.
153. PURRMANN R. — *Ann.*, 1940, 544, 182.
154. PURRMANN R. — *Ann.*, 1940, 546, 98.
155. RANSONE B. and ELVEHJEM G. — *J. Biol. Chem.* 1943, 151, 109.
156. RECORD P. and BETHKE R. — *Poultry Sci.*, 1942, 21, 271.
157. REGISTER, ELVEHJEM C. — *J. Biol. Chem.*, 1949, 177, 129.
158. REIMAN F., FRITSCH F. — *Klin. Wschr.*, 1934, 13, 951.
159. RICHARDSON L., BLAYLOCK L., GERMAN H., SHERWOOD R. — *Feder. Proc.*, 1949, 8, 393.
160. RICKES E., BRINK N., KONIUSKY F., WOOD T., FOLKERS K. — ???
161. ROBSCHKEIT-ROBBINS, MADDEN, ROWE, TURNER and WHIPPLE. — *Journ. Exper. Med.*, 1940, 72, 479.
162. ROMINGER E. and BOMSKOW C. — *Z. Exper. Med.*, 1927, 89, 818.
163. ROSSI. — *Arch. di Sci. Biol.*, 1941, 27, 481-510.
164. RUYSNIAK S. und ENGEL R. — *Dtsch. Med. Wschr.*, 1922, 58, 1592-1593.
165. SABRAZES J., BOURRET et LÉGER M. — *J. Physiol. Path. Gén.*, 1900, 2, 941-946.
166. SCABELL E. und BAREUTHER A. — *Dtsch. Med. Wschr.*, 1938, 64, 80-83.
167. SCHMIDT P. — *Arch. Hyg.*, 1907, 67, 1-22.
168. SCHUMACHER A. and HEUSER G. — *Poultry Sci.*, 1939, 18, 411.
169. SCHUMACHER A., HEUSER G. and NORRIS L. — *J. Biol. Chem.*, 1940, 135, 313.
170. SCHEMIN D., RITTENBERG D. — *J. Biol. Chem.*, 1945, 159, 567 ; *Ibid.*, 1946, 166, 621.

171. SHIVE W., RAVEL J., HARDING W., EAKIN R. — *J. Biol. Chem.*, 1948, 176, 990.
172. SHIVE W., RAVEL J., HARDING W., EAKIN R. — *J. Amer. Chem. Soc.* 1948, 70, 2299-2614.
173. SHIEVE J., RUNDLES R. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1949, 34, 439.
174. SHORB M., BRIGGS G. — *J. Biol. Chem.*, 1948, 176, 1463.
175. SIMMONS R. and NORRIS E. — *J. Biol. Chem.*, 1941, 140, 679.
176. SKEGGS H. et al. — *J. Biol. Chem.*, 1948, 176, 1459.
177. SMITH L. — *Nature*, 1948, 161, 638-676 ; *Ibid.*, 1948, 162, 144-45.
178. SMITH L. — *Lancet.*, 1948, 878.
179. SNELL E. and PETERSON W. — *J. Biol. Chem. (Proc.)*, 1939, 128, xciv, et *Journ. Bact.*, 1940, 39, 273.
180. SNELL E. and MITCHELL H. — *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.*, 1941, 27, 1.
181. SPIES T., STONES R. — *South Med. J.*, 1947, 40, 46.
182. SPIES T., STONES R. — *Lancet.*, 1947, 1, 174.
183. SPIES T., VILTER C., KOCK M., CADWELL M. — *South Med. J.*, 1945, 38, 707.
184. STOKSTAD E., P3GE A., PIERCE J., FRANKLIN A., JOKES T., HEINLE R., EPSTEIN M., WELCH A. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1948, 33, 360.
185. STOKSTAD E., PIERCE J., PAGE A., HOFFMAN I. — *I^{re} Cong. Int. Biochim.*, Cambridge, 1949, Abstract. 415/1, Section 1. p. 85.
186. SUBBAROW Y., JACOBSON B. and PROCHOWNICK V. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1936, 58, 2234.
187. SUBBAROW Y., JACOBSON B. and FISKE C. — *New England J. Med.*, 1935, 212, 663 et 1936.
188. STOKSTAD E. and MANNING P. — *J. Biol. Chem.*, 1938, 125, 687.
189. STOKSTAD E., MANNING P. and ROGERS R. — *J. Biol. Chem.*, 1940, 132, 463.
190. STOKSTAD E. — *J. Biol. Chem.*, 1941, 139, 475.
191. STRANDELL B. et SCHARTUM-HANSEN A. — *Acta Med. Scand.*, 1936, 88, 624.
192. STRANDELL B. — *Acta Med. Scand.*, 1935, 71.
193. TAYLOR F. et al. — *J. Clin. Invest.*, 1938, 17, 335.
194. TERROINE Th. — *Ann. Nutrit. Aliment.*, 1947, 1, 31.
195. TERRNBERG J., EAKIN R. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1949, 71, 3858.
196. *The Pharmacopeia of the United States of America*, U.S.P. XI, 1942, 485 ; U.S.P. XII, 1946, 553 ; U.S.P. XIII, 1947, 617 ; U.S.P. XIV, 1950, 683.
197. THORELL B. — *Acta Med. Scand.*, 1944, 117, 334 ; *Sem. Hôp. Paris*, 1948, 24, 1705.
198. TOUZE M. — Thèse de Sciences, Lyon, 1949.
199. TOCHOWICZ L. — *Folia Hematol.*, 1936, 56, 240.
200. TOMLINSON T. — *U.S. Publ. Health Service, Publ. Healt Repts.*, 1939, 54, 431.
201. TOPPING N. and FRASER H. — *U.S. Publ. Health Service, Publ. Healt Repts.*, 1939, 54, 416.
202. TOTTER J. et al. — *J. Biol. Chem.*, 1944, 152, 147.
203. TOTTER J., MIMS V. and DAY P. — *Science (N.-Y.)*, 1944, 100, 223.
204. TOTTER J. and DAY P. — *J. Biol. Chem.*, 1943, 147, 257.
205. TSCHESCHE R. und WOLF H. — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, 244, et *Ibid.*, 1937, 248, 34.
206. UCKO H. — *Z. Klin. Med.*, 1931, 117, 1-18, et *Ibid.*, 1931, 118, 221-241.
207. UNGLEY C. — *Lancet.*, 1936, 11, 1513.
208. UNGLEY C. — *I^{re} Cong. Int. Biochim.*, Cambridge, 1949, Abstract. 410/1, Section 1, p. 76.
209. *U. S. Pharmac.*, XIII, 3rd sheet suppl., 8 janvier 1950.
210. VEER, ELEHAUSEN, WIJMENGA H., LENS J. — *Biochem., Biophys. Acta*, 1950, 6, 225.
211. VERMEULEN M. — *Bull. Soc. Pharm. Marseille*, 1953, 1, 33.

212. WAISMAN H. and ELVEHJEM C. — *J. Nutrit.*, 1943, 26, 361-375.
213. WATERMANN L., KOH D. und HIRSCHFELD W. — *Nederlandsche Tijdschrift voor genneskunde*, 1937, 81, 2622-2532.
214. WEECH A., GOETTSCH E., REEVES E. — *J. Exp. Med.*, 1935, 61, 299-317.
215. WEST R. and HOWE M. — *J. Biol. Chem.*, 1930, 88, 427, et *Ibid.*, 1931, 94, 611.
216. WEST R. and MOORE H. — *Trans. Assoc. Amer. Physicians*, 1942, 57, 259.
217. WICHELS und HOFER. — *Klin. Wschr.*, 1934, 13, 1601.
218. WIELAND H. et PURRMAN R. — *Ann.*, 1940, 544, 163.
219. WIELAND H., TARTTER A. et PURRMANN R. — *Ann.*, 1940, 545, 209.
220. WHIPPLE C. — *Amer. J. Med. Sci.*, 1942, 203, 477.
221. WHIPPLE G. — *Amer. J. Med. Sci.*, 1938, 196, 609-621.
222. WHIPPLE G., HOOPER C., ROBSCHETT-ROBBINS F. — *Amer. J. Physiol.* 1920, 53, 167-205.
223. WHIPPLE G., ROBSCHETT-ROBBINS F. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1937, 36, 629-632.
224. WIJMENGA H., LENS J., MIDDELBEEK A. — *Cheem Weekblad.*, 1949, 45, 342.
225. WILKINSON J. — *Brit. Med. J.*, 1932, 1, 325 ; *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1933, 26, 1341 ; *Lancet*, 1936, 1, 354.
226. WILKINSON J. and KLEIN L. — *Lancet*, 1933, 11, 629.
227. WILLIAM. — *Nature*, 1948, 161, 19.
228. WILLS L. and STEWART A. — *Brit. J. Exper. Path.*, 1935, 16, 444.
229. WILLS L. — *Brit. Med. J.*, 1931, 1, 1059.
230. WILLS L. — *Indian J. Med. Research.*, 1932, 20, 391.
231. WILLS L., CLUTTERBUCK P. and EVANS B. — *Lancet*, 1937, 1, 311.
232. WILLS L. and BLIMORIA A. — *Indian J. Med. Res.*, 1932, 10, 391.
233. WILLS L., CLUTTERBUCK P. and EVANS B. — *J. Med. Res.*, 1932, 20, 391.
234. WILLS L., CLUTTERBUCK P. and EVANS B. — *Biochem. J.*, 1937, 31, 2136.
235. WILSON H., DOAN C., SASLAW S. and SCHWAB J. — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1942, 50, 341-343.
236. WINSTEIN W., EIGEN H. — *J. Biol. Chem.*, 1949, 17, 989 ; *Ibid.*, 1949, 181, 109.
237. WITTENBERG, SHERIN D. — *J. Biol. Chem.*, 1949, 178, 47 ; *Ibid.*, 1950, 185, 103.
238. WINTROBE M., CARTWRIGHT G. — *I^{re} Cong. Int. Biochim.*, Cambridge. 1949, Abstract. 411/1, Section 1, p. 78.
239. WOLF D. et al. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, 72, 2820.
240. WOLF D., WOOD R., VALIANT J., FOLKERS K. — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1950, 73, 15-17.
241. WRIGHT L. and WELCH A. — *Science (N.-Y.)*, 1943, 98, 179.
242. WRIGHT et al. — *J. Nutrit.*, 1943, 29, 289.
243. WRIGHT L., SKEGGS H., HUFF J. — *J. Biol. Chem.*, 1948, 175, 475.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	9
— Manifestations sanguines et médullaires des anémies et notions générales sur le mécanisme de production des anémies.....	9
— Tests d'activité des produits antianémiques et antipernicieux. Anémies expérimentales	18
— Principes antianémiques dans le groupe des vitamines B....	25
— Principe antipernicieux du foie	36
— Facteur gastrique et gastrothérapie	43
— Conclusions	47
— Objet du travail	50
PREMIERE PARTIE	
Recherche d'un test biologique du facteur hépatique antipernicieux ..	51
I. — <i>Technique mise en œuvre</i>	52
1° - Régime	52
2° - Prise de sang	53
3° - Numération globulaire	53
4° - Dosage de l'hémoglobine	53
5° - Valeur globulaire	54
6° - Réticulocytes	54
II. — <i>Caractères de l'anémie obtenue par inanition protéique prolon-</i> <i>gée chez le rat blanc adulte</i>	56
1° - Données hématologiques relatives aux animaux normaux..	56
2° - Etude de l'anémie expérimentale par inanition protéique....	57
III. — <i>Action des extraits hépatiques reconnus actifs dans l'anémie</i> <i>pernicieuse sur les rats anémiés par inanition protéique....</i>	61
1° - Essai qualitatif	61
2° - Essai quantitatif	67
3° - Mode opératoire	69
IV. — <i>Etude de la spécificité du test biologique proposé vis-à-vis du</i> <i>facteur hépatique antipernicieux</i>	71
DEUXIEME PARTIE	
Contribution à la mise au point du contrôle biologique de la purifica- tion des extraits hépatiques	79
I. — <i>Contrôle biologique de la purification des extraits hépatiques..</i>	80
II. — <i>Sur la nature du facteur hépatique antipernicieux</i>	95
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	101
BIBLIOGRAPHIE	107

IMPRIMERIE VILLARD

— MARSEILLE —